UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1974 - N° 608

CONTRIBUTION A LA RECHERCHE ET AU DOSAGE DE L'ALPHA 1 FŒTOPROTÉINE DANS LE SÉRUM HUMAIN

APPLICATIONS EN GASTROENTÉROLOGIE

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de LYON
Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
le 10 Janvier 1974

par

Nadine BOREL-GIRAUD née DAVENAS
le 3 Octobre 1944
à SAINT-HÉAND (Loire)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544715_0023

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1974 - N° 608

CONTRIBUTION A LA RECHERCHE ET AU DOSAGE DE L'ALPHA 1 FŒTOPROTÉINE DANS LE SÉRUM HUMAIN APPLICATIONS EN GASTROENTÉROLOGIE

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de LYON
Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
le 10 Janvier 1974

par

Nadine BOREL-GIRAUD née DAVENAS
le 3 Octobre 1944
à SAINT-HÉAND (Loire)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

Président de l'Université :J. BOIDIN
Premier Vice-Président : R. TOURAINE

●●●

Secrétaire Général : M. IZAUTE

○○○

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITE

Médecine -	GRANGE-BLANCHE	- Directeur :	Professeur	GERMAIN D.
	ALEXIS-CARREL	- Directeur :	Professeur	GIROD C.
	SUD-OUEST	- Directeur :	Professeur	TOLOT F.
	LYON-NORD	- Directeur :	Professeur	BERTOYE A.

Biologie Humaine : Directeur : Docteur CZYBA R. (Maître de Conférences Agrégé)

Techniques de Réadaptation : Directeur : Professeur MORGON A.

Sciences Pharmaceutiques : Directeur : M. CARRAZ (Maitre de Conférences Agrégé)

Sciences Odontologiques : Directeur : Docteur VINCENT R.

Institut Régional d'Education Physique et Sportive : Directeur : Professeur MILLON

Mathématiques : Directeur : Doyen BRACONNIER.

Physique : Directeur : Professeur DUFAY.

Chimie et Biochimie : Directeur : Professeur GAUTHERON.

Sciences de la Nature : Directeur : Professeur DAVID L.

Biodynamique et Psychopédagogique : Directeur : Professeur FONTANGES R.

Institut Universitaire de Technologie n° 1 : Directeur : Professeur POUYET B.

Institut Universitaire de Technologie n° 2 : Directeur : Professeur GALLET J.

Observatoire : Directeur : Professeur BIGAY J.H.

Physique Nucléaire : Directeur : Professeur SARAZIN A.

Mécanique : Directeur : Professeur MATHIEU J.

●○●

Examinateurs de la Thèse :

Président	:	**Monsieur le Professeur J. DORCHE**
Assesseurs	:	Monsieur le Professeur M. GIRARD
		Monsieur le Professeur A. BEL
		Monsieur le Professeur Agrégé C. QUINCY
		Mademoiselle M. NYSSEN Docteur en Pharmacie.

A MES PARENTS

Nous leur dédions cette thèse.
Qu'elle soit la marque de toute la tendre affection que nous leur portons et qu'ils soient remerciés de la merveilleuse compréhension que nous espérons toujours trouver en eux.

A MON MARI

Que notre union lui apporte tout le bonheur souhaité.

A MES ENFANTS Annabelle et Cédric

Qui nous procurent tant de fierté et de joie.

A MES FRERES

En souvenir des heureux moments partagés.

A MA GRAND-MERE

Qu'elle soit assurée de toute notre affection.

A MA BELLE FAMILLE

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Nous avons beaucoup apprécié l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire. Il a bien voulu nous confier ce travail dont le caractère d'actualité nous a vivement intéressé ; c'est avec grand plaisir que nous travaillons sous sa bienveillante direction.

Nous formulons le vœu de ne pas trop le décevoir dans la grande confiance qu'il nous témoigne.

Nous ne saurions assez lui exprimer notre respectueuse gratitude.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur GIRARD

Nous avons passé dans son service un semestre d'interne.
Le grand intérêt qu'il porte à la biologie s'est à nouveau manifesté par la coopération apportée à la réalisation de ce travail.

Qu'il trouve ici l'assurance de notre profond respect.

Monsieur le Professeur BEL

Sa collaboration toujours efficace, son extrême amabilité nous ont grandement aidée à l'élaboration de cette thèse.

Qu'il veuille bien croire en nos sentiments reconnaissants.

Monsieur le Professeur agrégé QUINCY

Conservant l'excellent souvenir d'un semestre passé dans son service, nous le remercions d'avoir bien voulu juger cette thèse et lui exprimons notre respectueux dévouement

Mademoiselle M. NYSSEN Docteur en Pharmacie
Directeur adjoint du laboratoire de Biochimie de l'Hôpital de la Croix-Rousse.

Cette thèse est la poursuite d'un travail entrepris par elle il y a plusieurs années ; nous avons largement bénéficié de son aide et ses conseils.

Nous sommes heureuse qu'elle ait accepté de siéger parmi nos juges en nous donnant ainsi une preuve d'amitié.

Qu'elle soit assurée de notre reconnaissance.

NOS REMERCIEMENTS VONT AUSSI

à **Monsieur le Professeur PLAUCHU**

Monsieur le Professeur VACHON

Monsieur le Docteur SAINT CYR (Bourg)

qui ont bien voulu nous autoriser à consulter les observations de leurs services.

Nous tenons à remercier les personnes qui nous ont particulièrement aidéedans la mise au point de la partie technique de cette thèse.

Monsieur le Docteur Ch. TREPO

Mademoiselle M. MATHIEU

Monsieur BAROUH (Laboratoire Sebia)

INTRODUCTION GENERALE

Le foetus possède certaines protéines (209) qui lui sont propres : leur taux devient en effet pratiquement nul quelques jours après la naissance et le restera toute la vie sauf circonstances exceptionnelles

En 1970, dans les limites de nos connaissances, on pouvait dire que ces circonstances exceptionnelles étaient l'apparition de certaines formes de cancer, la plus fréquente et très vite la plus remarquée était l'hépatome. Parmi les protéines foetales une seule semblait en cause **l'alpha foetoprotéine.**

Mais tous les hépatomes ne s'accompagnent pas d'une réapparition d'alpha foetoprotéine ; les cas négatifs sont-ils liés a des formes anatomo-cliniques particulières ou ne sont-ils pas dus à l'insuffisance des techniques de détection ? Les recherches entreprises, en permettant de répondre à cette question, en ont posé d'autres concernant la réapparition de très faibles quantités d'alpha foetoprotéine dans d'autres affections hépatiques.

Le but de notre travail est la mise au point de techniques de détection et de dosage de l'alpha foetoprotéine, aussi sensibles que possible et d'application suffisamment aisée pour être pratiquées par tous les laboratoires de Biochimie.

Ces techniques ont été appliquées au sérum de différents malades hospitalisés dans les services de Gastroentérologie, en particulier dans ceux des professeurs Marcel GIRARD et André BEL.

TRAVAUX ANTERIEURS

I – INTRODUCTION

Dès 1944, PEDERSEN (164) découvre dans le sérum du veau nouveau-né une protéine qui n'existe pas dans le sérum de l'animal adulte : il s'agit d'une alpha 1 globuline intitulée "fétuine". Par la suite, des foetoprotéines de mobilité alpha 1 analogue devaient être décrites chez de nombreux autres foetus de mammifères : bovins, rongeurs, chat, chien, phoque, singe. (130)

En 1955, BERGSTRAND et CZAR (29-30) décrivent dans le sérum de foetus humains âgés de neuf à dix neuf semaines une bande protéique qui migre en électrophorèse entre l'albumine et les alpha 1 globulines. DE MURALT et ROULET (143) confirment ces résultats et ne retrouvent pas cette bande après le quatrième mois de la vie foetale. TATARINOV (208) MASOPUST et KOTAL (127) GITLIN et BOESMAN (82-84) au contraire montrent que cette alpha foetoprotéine se trouve encore dans le sang du cordon et que chez le nouveau-né, elle disparait dans les trois premières semaines de la vie.

En 1963 ABELEV (1-2) démontre qu'une alpha globuline présente dans le sérum des embryons de souris peut réapparaitre dans le sérum de souris adultes présentant un carcinome chimiquement induit par l'orthoamino-azotoluène. Des résultats identiques furent obtenus par STANISLAWSKI-BERENCWAJC et GRABAR (204) chez le rat. Pour la première fois la réapparition chez un sujet adulte d'une protéine embryonnaire pouvait être rattachée à un processus de cancérisation. Ce fait expérimental est confirmé l'année suivante par TATARINOV (207) : cet auteur met en évidence l'alpha 1 foetoprotéine dans le sérum de malades porteurs de cancers primitifs du foie. Les travaux de MASOPUST (128) ABELEV (2-3-4) ainsi que d'autres chercheurs (9-48-70-145-184-206) confirment l'intérêt diagnostique de la recherche de l'AFP * dans le cancer primitif du foie, tout en précisant que cette protéine ne réapparait que chez 60 à 80 % environ des malades porteurs d'hépatome. Cependant dès 1967, ABELEV (4) puis URIEL (212) MASOPUST (128) et enfin en 1969 MAWAS (137-138) signalaient la présence d'AFP dans le sérum de malades atteints de tératomes ovariens et testiculaires ; le plus souvent il s'agissait d'enfants.

En 1970 ABELEV apporte des éléments nouveaux lors d'un colloque à Bruges (6) . utilisant une méthode autoradiographique environ 50 fois plus sensible que les tests usuels de routine, il mettait en évidence l'AFP dans le sérum de rat partiellement hépatectomisé et transitoirement dans le sérum de quelques malades atteints d'hépatite virale. Grâce à une méthode radioimmunologique, RUOSLAHTI (180) tout récemment démontre la présence d'AFP dans le sérum humain normal.

Dans de nombreux articles consacrés à ce sujet, les auteurs désignaient souvent une même foetoprotéine par des noms différents ce qui ne laissait pas d'engendrer une certaine confusion. C'est pourquoi le problème de la terminologie a été évoqué et qu'a été publié dans le bulletin de l'organisation mondiale de la santé (5) une normalisation des termes employés. Dans tous les cas elle est nommée alpha foetoprotéine, excepté pour l'alpha 1 protéine foetospécifique de boeuf appelée Fétuine.

*AFP : alpha foetoprotéine abréviation utilisée dans la suite de la thèse.

II – PHYSIOLOGIE

2-1- BIOSYNTHESE (74)

La biosynthèse de l'AFP semble être localisée tout au moins chez l'homme, essentiellement au foie foetal et à certains tissus cancéreux, parmi lesquels l'hépatome primitif. Lors de l'incubation des tissus embryonnaires d'homme et de rat, en présence d'aminoacides marqués par le carbone radioactif, GITLIN et BOESMAN (83) ont noté la formation d'AFP dans le foie foetal des deux espèces. En revanche, la protéine n'était pas synthétisée par le cerveau, le poumon, les muscles cardiaques et squelettiques, la paroi intestinale, la peau. De même la rate, le thymus et les poumons du foetus ainsi que le foie, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse prélevées chez des adultes étaient incapables de réaliser la synthèse. Celle-ci a été observée dans la culture de tissus placentaires. L'AFP a été mise en évidence dans le sac vitellin de l'homme (85-86) de la souris (124) et en très faibles quantités dans le tissu gastrointestinal du foetus. Chez le requin GITLIN (85) a montré que cette protéine est surtout formée par la muqueuse gastrique alors que dans le foie sa synthèse est très faible. Ce fait indiquerait, d'après l'auteur que primitivement le lieu de synthèse etait essentiellement le tube digestif et que le foie et le sac amniotique, deux protubérances de l'endoderme ne devenaient les sites prédominants de la synthèse qu'au cours de l'évolution ontogénique ultérieure (202).

La production de l'AFP par certains tissus cancéreux et avant tout par l'hépatome primitif a eté démontrée par de nombreux auteurs (2-6-68-89-138-151-201) chez l'homme et expérimentalement chez des animaux (43-71-105-146-147-148-213).

2-2- METABOLISME

Le métabolisme de l'AFP est très mal connu. On connait son passage dans le plasma sanguin à partir du foie foetal ou à l'âge adulte à partir de certains tissus cancéreux. Sa demi-vie dans ce milieu semble être courte, un, trois et neuf jours suivant divers auteurs. Elle passe dans les urines et à travers le placenta. Elle apparait également dans le liquide d'ascite qui accompagne certaines tumeurs malignes humaines ou expérimentales.

2-3- ROLE BIOLOGIQUE

URIEL et ses collaborateurs (218) à la suite des travaux de SOLOF aux Etats-Unis, NUNEZ en France (154) ont démontré que l'AFP du sérum foetal de souris et du sérum d'un malade atteint du cancer primitif du foie possèdent toutes les deux la même propriété de fixation spécifique des oestrogènes (oestradiol et oestrone). Cette activité de fixation d'oestrogènes, dont le rôle de "régulateur" dans les processus de différentiation cellulaire est bien connu, ouvre d'autres perspectives et donne un nouvel intérêt à l'étude des antigènes cellulaires transitoires.

2-4- REPARTITION DANS L'ORGANISME

Physiologiquement la présence d'AFP peut être observée chez l'homme a différents stades de la vie.

Chez le foetus humain, l'AFP apparait tôt dans le plasma sanguin, son taux passe par un maxi-

mum au cours de l'évolution embryonnaire pour diminuer ensuite progressivement jusqu'à la naissance, comme l'ont montré de nombreux rapports (114-205). D'après GITLIN et BOESMAN (94) le sérum sanguin d'un foetus de 6 semaines en renferme 66 mg/litre. Le taux s'élève à la valeur maximale de 2700 mg/litre à la 13è semaine de la grossesse et tombe à 80 mg/litre entre les 18è et 22è semaines. La baisse progressive est déterminée par la baisse de la synthèse de l'AFP. Le liquide amniotique contient aussi de l'AFP, le taux n'est détectable que par des méthodes sensibles ; il varie avec l'âge embryonnaire, c'est pourquoi le dosage d'AFP du liquide amniotique peut servir à apprécier l'âge de la gestation (193) . L'AFP passe également dans les urines du foetus qui peuvent en renfermer de 50 à 100 mg/litre. Le sang de cordon en contient aussi. Dès la naissance, la concentration sérique de l'AFP subit une chute spectaculaire : la diminution s'effectue suivant une loi exponentielle (114) durant la première semaine. Le taux de disparition est indépendant de la concentration initiale à la naissance Après vingt jours, toute trace d'AFP a disparu du torrent circulatoire ; la réapparition de la protéine au delà de la 3è semaine doit faire suspecter un état pathologique.

Chez l'adulte, l'AFP n'est pas détectable par les techniques habituelles de précipitation en gel et de contre immunoélectrophorèse (12). Cependant RUOSLAHTI et SEPPALA (180) ont démontré grâce à une technique radioimmunochimique que tout sérum adulte normal contient 0,001 à 0,017 mg/litre d'AFP. ABELEV (7), SEPPALA (190), par ces mêmes techniques l'ont mise en évidence à un taux plus élevé chez toutes les femmes enceintes de plus de quinze semaines.

III – MECANISME DE LA REAPPARITION DE L'AFP

Plusieurs hypothèses sont avancées et peuvent expliquer la présence d'AFP dans le sérum de malades où elle est actuellement mise en évidence.

3-1- HYPOTHESES :

- Dédifférenciation cellulaire : Certaines cellules reviennent à un stade embryonnaire peu différencié, stade où les hépatocytes sont aptes à synthétiser l'AFP (76-214-216-221).

- Existence d' "hépatoblastes" peu différenciés qui évoluent en donnant des cellules secrétrices d'AFP et des hépatocytes siéges de la synthèse des protéines adultes. Un déséquilibre entre le nombre respectif des cellules de ces deux lignées permettrait une prolifération des cellules productrices d'AFP (49-157).

- Dérépression génétique : au cours du développement foetal , le gène régulateur de la synthèse d'AFP produit un répresseur contrôlant dans les hépatocytes l'anabolisme de l'AFP. A la 32è semaine de gestation, le répresseur exerce un blocage total de cette synthèse, blocage exercé durant la vie entière d'un individu sain. Dans certaines circonstances , le blocage est levé (pour une cause inconnue) : la dérépression exercée permet la reprise de la synthèse de l'AFP (4-6-138-215-216).

3-2- MISE EN EVIDENCE :

3-2-1- Au cours des hépatomes.

C'est la théorie d'ABELEV qui est la plus souvent avancée . "phénomène de dérépres-

sion génétique permettant la fabrication d'une protéine normalement synthétisée pendant le développement foetal". Depuis PURVES (171) et RUOSLAHTI (180) ont trouvé des traces d'AFP chez l'adulte sain ; il semble donc en fait que cette répression ne soit pas totale.

3-2-2- Au cours des tératomes.

MAWAS explique la présence d'AFP par ce même phénomène. Certains auteurs (3-128-129) ont imaginé que la tumeur pouvait secréter cette protéine sans cependant apporter d'arguments morphologiques détaillés . la synthèse se ferait dans les cellules hépatiques adultes ou immatures. Une étude microscopique précise faite par WEISS (224) montre que de telles cellules n'ont pas été observées dans le cas de dysembryone. Il n'existe aucun aspect morphologique en faveur de la production d'AFP au niveau de la tumeur. C'est pourquoi on envisage aussi ici la possibilité d'une synthèse anormale de la protéine par un mécanisme de dérépression (214-217) pouvant survenir dans n'importe quel tissu (MAWAS). Des etudes récentes montrent en effet que l'AFP peut être mise en évidence dans les desembryones par l'étude des broyats cellulaires ou par immunofluorescence.

3-2-3- Au cours de cancers secondaires hépatiques.

ABELEV pense qu'il est très peu probable que la tumeur primitive soit à l'origine de l'AFP. Au contraire d'autres auteurs (61) affirment que l'origine de l'AFP est vraisemblablement tumorale : elle serait secrétée soit par la tumeur primitive soit par les métastases hépatiques.

3-2-4- Au cours des cancers primitifs autres que l'hépatome.

La présence d'AFP dans ces cancers vient corrober l'affirmation précédente. S'appuyant sur les expériences de GITLIN (83) prouvant que la synthèse d'AFP se fait exclusivement au niveau du foie et du sac vitellin, on pourrait envisager qu'un facteur d'origine tumorale induirait la synthèse d'AFP par l'hépatocyte. Néanmoins deux arguments sont assez convaincants pour penser que le tissu malin est capable de synthétiser l'AFP :

- Après l'exérèse de la tumeur, l'AFP disparait du sérum (33)

- Chez le foetus, l'hépatocyte n'est que le siège exclusif de la synthèse de l'AFP : des traces sont retrouvées dans le tractus intestinal.

3-2-5- Au cours des hépatites

Lors de cytolyses expérimentales l'AFP apparait chez l'animal. ABELEV (7) l'a mise en évidence dans le sérum de souris après inhalation de vapeurs de tétrachlorure de carbone et après hépatectomie partielle. DE NECHAUD (146) a obtenu des résultats analogues chez des rats. L'AFP est révélée dans les hépatocytes par immunofluorescence a partir du deuxième jour et beaucoup plus visiblement le troisième jour, à la suite d'une hépatectomie partielle. Chez l'homme, l'AFP peut également apparaitre dans le sérum pendant les phases de régénération hépatique intense qui aboutissent à l'apparition d'hépatocytes soit embryonnaires, soit á maturité incomplète (76).

3-2-6- Au cours de la tyrosinémie héréditaire.

BELANGER (27) par des études en immunofluorescence confirme l'origine hépatique de l'AFP dans cette maladie : il pense qu'un phénomène inducteur inhérent à la maladie s'ajoute au processus non spécifique de la régénérescence hépatocellulaire.

IV – ETUDE ANALYTIQUE

4-1- ISOLEMENT ET PURIFICATION

Les difficultés rencontrées par les biochimistes dans l'isolement de l'AFP ont retardé l'étude de ses propriétés physicochimiques. Les sources d'AFP sont les liquides biologiques les plus riches en AFP :

- sérums de foetus humains de 5 à 7 mois dont le taux en AFP est d'environ 20 g/litre (150-177),
- sérums de malades porteurs d'hépatomes ou de tératoblastomes (119),
- liquides d'ascite tumorale riches en AFP (175).

■ les techniques biochimiques classiques d'isolement ne permettent pas de la séparer de l'albumine et de l'alpha antitrypsine (18-165-175),

■ les techniques biochimiques suivies d'une purification immunochimique, procurent une AFP hautement purifiée (174). L'isolement et la cristallisation ont été réalisés en 1970 par LEHMANN (120) à partir de sérum d'un malade atteint d'hépatome. Le sérum est soumis à des relargages successifs par le sulfate d'ammonium ; après dialyse contre un tampon phosphate , on procède à une première purification par chromatographie échangeuse d'ions sur D.E.A.E. A 50 Sephadex. On ne recueille que les fractions qui donnent une réaction immunologique positive avec un immun-sérum de lapin anti AFP. Après relargage, une deuxième purification est effectuée par filtration sur gel de Sephadex G 100. Les impuretés protéiques présentes sont précipitées par addition d'un antisérum de lapin anti albumine ou anti IgG humaines. Après un certain nombre de nouveaux relargages par le sulfate d'ammonium , LEHMANN obtient des aiguilles blanches , allongées et soyeuses. La pureté de la protéine cristallisée a été ensuite testée par deux procédés : l'immunoélectrophorèse et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (pureté = 97 %).

■ les méthodes immunochimiques sont utilisées par NISHI (149) et RUOSLAHTI (177). Ce sont les plus courantes actuellement. Elles consistent à préparer un immunsérum par les voies classiques ; dans un second temps , l'AFP contenue dans un sérum riche est précipitée par cet immunsérum. Le complexe Antigène-Anticorps est ensuite dissocié à pH 1,8 afin de séparer les immunoglobulines de lapin. Après une chromatographie sur colonne et une filtration sur Sephadex G 100 , on obtient une AFP pure. Les techniques les plus récentes utilisent l'électrofocalisation, c'est ainsi qu'ALPERT (19) prépare l'AFP en 3 étapes : électrophorèse sur gel, filtration sur Sephadex G 75 et électrofocalisation.

4-2- PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

Les principales caractéristiques ont eté déterminées par GITLIN et BOESMAN (82) MASOPUST (129) , NISHI (149-150) RUOSLAHTI (177-178) , ABELEV (7) , ALPERT (18-19).

Le tableau 1 regroupe quelques propriétés déterminées par ces auteurs.

TABLEAU I

		REFERENCES
Constante de sédimentation	5,05 4,5 5,0	129 149 – 150 82
Poids moléculaire	64 600 65 000 70 000 72 000 74 000 75 500	149 – 150 82 7 – 177 – 178 19 18 129
Point isoélectrique	4,75 4,78 ± 0,05 2 formes 4,85 5,2 5,08	177 – 178 18 19 129
Mobilité électrophorétique	$6,08 \times 10^{-5}$ cm^2 V^{-1} sec^{-1}	129

Propriétés physicochimiques de l'AFP

C'est une glycoprotéine constituée d'un polypeptide à chaine unique (150-178) renfermant 3 % (150) à 4,3 % (178) de glucides et deux moles d'acide sialique. Cette faible teneur est confirmée par l'action pratiquement nulle de la neuramidase sur la mobilité de l'AFP (19-172). Une comparaison faite par plusieurs auteurs (149-173-178) entre l'AFP de foetus humains et de malades atteints de cancer hépatocellulaire montre que ces deux protéines ont des mobilités électrophorétiques analogues et sont immunologiquement identiques. Leur composition en acides aminés est similaire. RUOSLAHTI et SEPPALA ont comparé les produits de digestion trypsique en dressant un tableau des acides aminés : ils en ont décelé une trentaine et n'ont pu trouver de différence entre ces deux protéines (178). MASOPUST (129) , GITLIN (82) et d'autres chercheurs (104-107- 188-225) ont mis en évidence l'AFP dans le sérum foetal d'un grand nombre d'espèces animales ; les

différences avec l'AFP humaine portent sur le poids moléculaire (129-203), la vitesse de migration électrophorétique, la teneur en glucides (135). L'immunoélectrophorèse montre qu'elles migrent toutes comme une alpha 1 globuline.

4-3- MISE EN EVIDENCE

L'évolution des techniques au cours des dix dernières années a entrainé une amélioration progressive de la sensibilité de détection.

La recherche d'AFP peut s'effectuer dans le sérum sanguin, les liquides de ponction (ascite, pleural), les urines, les broyats de tissus.

4-3-1- Procédés électrophorétiques

L'électrophorèse sur divers supports permet de mettre en évidence l'AFP dans le sérum ; c'est ainsi qu'elle a été découverte à l'aide du support le plus simple le papier (75). Mais cette technique ne permet de la déceler qu'à des taux supérieurs à 500 mg/litre (162). De nombreuses modifications ont été apportées. BERGSTRAND et CZAR (30) ont été les premiers a concentrer les sérums par évaporation sous pression réduite. Au papier, ont succédé l'acétate de cellulose (35-70-82), le gel d'amidon (172), le gel d'acrylamide dont le haut pouvoir résolutif permet d'abaisser le seuil de détection a 60 mg/litre (114). L'électrophorese en acrylamide agarose (212-214-215) est également utilisée par différents auteurs. Il est nécessaire de prolonger au maximum le temps de migration pour obtenir une séparation suffisamment nette entre l'albumine et l'AFP : BERGSTRAND et CZAR (30) laissaient migrer l'albumine à 14 cm de la zone de dépot du sérum. Les colorants classiques pour la révélation des protéines sont utilisables, bleu de bromophénol, noir amide, rouge ponceau, et nigrosine (55).

L'électrophorèse de zone manque de sensibilité, elle convient a l'analyse de sérums foetaux ou de sangs de cordons.

4-3-2- Procédés immunochimiques

4-3-2-1- Généralités

Immunsérums anti alpha foetoprotéine.

Il est bien certain que l'avantage essentiel des dosages immunologiques repose sur leur spécificité et leur sensibilité. La qualité du réactif utilisé va donc conditionner la valeur de la méthode. On peut obtenir un immunsérum monospécifique par deux voies bien différentes la première consiste à utiliser comme antigène * une protéine hautement purifiée - c'est sans conteste le réactif le plus satisfaisant, mais également le plus difficile a obtenir. On peut rendre aussi monospécifique un immunsérum polyspécifique en saturant les anticorps ** par addition des protéines correspondantes

* Antigène Ag : abréviation utilisée dans la suite de la thèse.
** Anticorps Ac : abréviation utilisée dans la suite de la thèse

Figure 1

● Anticorps

○ Antigène

Arcs de précipitation d'un complexe Ag-Ac

♦ Jusqu'en 1971 les deux sources d'antigènes utilisables étaient le sérum de malades atteints d'hépatomes (214) ou le sérum de foetus âgés de 4 à 5 mois (70-82-94-114-168). Sur des lapins "Géant des Flandres" on pratique des injections intradermiques d'un mélange à parties égales d'adjuvant complet de Freund et de sérum riche en AFP (pool de sérum de malades atteints d'hépatomes) les injections sont répétées à intervalles réguliers jusqu'au 31è jour en alternant les voies intramusculaires et intraveineuses. L'immunsérum obtenu est rendu monospécifique par addition de sérum adulte sain (3-4) et de sérum de malades porteurs d'une cirrhose.

♦ NISHI (45) utilise des complexes Ag-Ac pour l'immunisation. Le premier temps de la méthode consiste à préparer un immunsérum par la voie précédemment décrite. Dans le second temps, l'AFP contenue dans un sérum riche (de foetus ou d'hépatome) est précipitée par l'immunsérum. Puis les précipités d'AFP humaine et d'anticorps de lapin servent à immuniser un cheval (126).

♦ En employant de l'AFP pure ou semi purifiée pour l'immunisation, on élimine les étapes intermédiaires de la préparation des immunsérums, c'est-à-dire les absorptions. Il ne peut exister par ailleurs d'anticorps "parasites" dirigés contre des protéines et capables de donner de fausses réactions positives (fragment de fibrinogène alpha 2 H - ou beta foetoprotéine présents parfois dans les sérums d'hépatomes) Les travaux de GOUSSEV et JOSOVA (88) ALPERT et ses collaborateurs (18) RUOSLAHTI et SEPPALA (177) illustrent cette méthode.

♦ MASSEYEFF (135) mélange 100 microgrammes d'AFP pure à l'adjuvant de Freund ; l'injection par le nodule lymphatique conduit chez le lapin à l'obtention d'un excellent immunsérum.

La spécificité de l'immunsérum ainsi préparé, est testée en immunoélectrophorèse : on ne doit avoir aucun précipité avec un sérum humain normal ; en présence d'un sérum de foetus , on obtient un seul arc de précipitation de mobilité alpha 1.

Principe général des procédés immunochimiques.

OUDIN en 1946 a introduit l'analyse qualitative puis quantitative d'un mélange d'antigène par diffusion et précipitation spécifique en gel. Le principe de cette méthode est le suivant : la réaction d'un antigène avec l'anticorps correspondant donne lieu à la formation d'une seule zone de précipitation dans des "conditions convenables".

– Les techniques de diffusion sont ordinairement classées en deux groupes

• Diffusion simple

L'un des réactants du système Ag-Ac se trouve en solution et diffuse dans un gel contenant l'autre réactant : c'est la méthode la plus simple.

• Double diffusion

Les solutions d'Ag et d'Ac sont séparées l'une de l'autre par une épaisseur de gel dans laquelle elles diffusent. Cette réaction peut être réalisée soit en tubes, soit en plaques, soit en cellules. C'est la méthode d'OUTCHERLONY (160-161) utilisée pour la détection de l'antigène Australia et de l'alpha foetoprotéine.

– Quelques rappels de base d'immunologie. La réaction antigène-anticorps se caractérise par deux faits importants (87).

• qualitativement, la réaction Ag-Ac est spécifique

• quantitativement, l'Ag se combine à l'Ac en différentes porportions mais le phénomène de zone peut se produire . en effet les complexes Ag-Ac contenant un excès de l'un ou l'autre des réactants ont tendance à rester solubles, tandis que pour des proportions voisines du point d'équivalence, il se forme un précipité La diffusion se fait toujours dans le sens opposé à celle de l'accroissement de la concentration (figure 1).

*4-3-2-2- Double immunodiffusion selon OUTCHERLONY (DID *)*

C'est la méthode de détection utilisée habituellement Elle a été la première technique proposée pour le dépistage du cancer primitif du foie (47-48-81-94-157-212)

Grâce à un emporte-pièces , on pratique dans un gel d'agar ou d'agarose coulé dans des boites de Pétri ou sur plaques , des rosettes comprenant six trous périphériques et un trou central. Le puits central reçoit l'antisérum , les puits périphériques reçoivent soit le sérum témoin positif, soit les sérums a tester. Après diffusion de 24 heures en chambre humide et à température ambiante, la lecture est effectuée sur fond noir en lumière oblique. Pour faciliter la lecture, on a proposé (94) de procéder à une coloration par le bleu de Coomassie, le noir amide ou l'azocarmin (61) Dans ce cas l'excès de protéines doit être préalablement éliminé par lavage prolongé (3 ou 4 jours) des gels dans du sérum physiologique. Un sérum est positif lorsqu'il donne avec l'antisérum une ligne de précipitation montrant une identité antigénique complète avec le sérum témoin positif.

De nombreuses modifications ont été apportées

- les sérums négatifs après 24 heures de diffusion sont réexaminés après 3 ajouts successifs dans le puits correspondant (214). Les sérums ne donnant pas de réaction dans ces conditions sont considérés comme négatifs.

- Les serums négatifs peuvent être concentrés 4 fois soit par dialyse soit par lyophilisation (185) et redissous à raison de 100 mg dans 0,2 ml (185) ou 0,3 ml d'eau (214).

- ABELEV (3) considère non seulement comme positif une ligne de précipitation entre un puits d'Ag et le puits d'Ac , mais encore une légère déviation de l'arc de précipitation temoin, par une quantité minime d'Ag diffusant du puits adjacent.

- MASSEYEFF (132) préconise une technique assez voisine de la précédente, dite du "triangle". Le principe consiste à rechercher au niveau de l'échantillon examiné la jonction entre deux lignes de précipitation témoin. Cette jonction indique que le sérum examiné est positif.

La composition du gel dans lequel s'effectue la diffusion varie légèrement suivant les auteurs (tableau 2)

TABLEAU 2

GEL		TAMPON		Références
Nature	Concentration	Nature	pH	
agarose	1,5 %	NaCl tris EDTA	7,6	214
agarose	0,9 %	barbital	8,2	38
agar	1,5 %	boraté	8,4	32
agar	1,0 %	barbital	8,6	70
agar	0,9 %	barbital	8,2	10

Double Immunodiffusion : composition du gel

* DID Double Immunodiffusion : abréviation utilisée dans la suite de la thèse.

Cette technique de recherche présente deux inconvénients majeurs délai de réponse de plusieurs jours et surtout manque de sensibilité. Il est difficile de déceler des taux inférieurs à 5 mg/litre.

*4-3-2-3- Electroimmunodiffusion selon LAURELL (EID *)*

Cette technique de dosage peut être utilisée comme méthode de recherche. Elle sera décrite en détail parmi les méthodes quantitatives. NORGAAD-PEDERSEN (153) effectue la migration de l'Ag dans un gel d'agar contenant l'Ac pendant 18 heures sous une tension de 5 volts/cm et il estime la sensibilité de cette recherche à 0,2 mg/litre. A Rouen, GEFFROY et ses collaborateurs (61) par cette même méthode obtiennent des lignes de précipitation pour des concentrations de l'ordre de 0,1 mg/litre. Il apparait donc que la technique de LAURELL est plus sensible que la double immunodiffusion.

4-3-2-4- Immunoélectrophorèse

Elle n'est pas appliquée couramment à la recherche d'AFP. Elle permet un contrôle de la pureté des immunsérums ; par ailleurs en cas de réaction positive après immunodiffusion elle confirme la spécificité de la réponse immunologique. Toutefois grâce à elle en 1967 BURTIN (47) a décelé huit protéines dans le sérum foetal humain dont une tout à fait spécifique "l'alpha 1 fétuine".

*4-3-2-5- Immunoélectrophorèse à contre courant (IECC **)*

BASSARD en 1959 décrivait une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation électrophorètique (24). Il lui donnait le nom d'électrosynérèse.

Actuellement elle est appelée :

- électrophorèse en crossing over
- électrophorèse en sens opposé
- immuno-osmophorèse
- contre immunoélectrophorèse
- electroimmunodiffusion
- immunoprécipitation électrophorétique ; ces deux derniers termes réservés plutôt à la technique de LAURELL.

Cette technique est couramment utilisée pour la détection de l'antigène Australia (60-87-166) KOHN (110) et ALPERT (15) l'ont adaptée à la recherche de l'AFP. C'est le principe de l'électrophorèse en sens opposé. Dans les conditions utilisées, l'AFP se déplace vers l'anode, comme une globuline alpha 1 tandis que l'anticorps tend à gagner la cathode. Lorsque l'antigène et l'anticorps se rencontrent une ligne de précipitation apparait.

Les techniques de KOHN et d'ALPERT diffèrent sur plusieurs points résumés dans le tableau 3.

* EID Electroimmunodiffusion : abréviation utilisée dans la suite de la thèse
** IECC Immunoélectrophorèse à contre courant : abréviation utilisée dans la suite de la thèse.

TABLEAU 3

	ref 109	KOHN ref 110	ref 110	ALPERT ref 16
Support	gel d'agar 1,25 %	gel d'agar 1 %	acétate de cellulose	agarose 0,9 %
Tampon	barbital pH 8,6	barbital pH 8,6		barbital pH 8,6
Diamètre du puits recevant Ag	4 mm	2 - 3 mm	gouttes de 0,2 à	3 mm
Ac	7 mm	2 - 3 mm	5 µl	3 mm
Durée de migration	90 à 150 mn	60 à 90 mn	40 à 60 mn	60 mn
Voltage en V/cm	20	20		
Intensité en mA/cm	1,2 à 1,5	1,2 à 1,5	0,5	0,4
Coloration		nigrosine	nigrosine	noir amide

Immunoélectrophorèse à contre courant : caractéristiques des techniques utilisées

Des puits sont creusés à l'emporte-pièces dans un gel coulé sur une plaque de verre. La plaque est mise dans une cuve à électrophorèse. Le contact avec le tampon se fait grâce à des ponts de gélose ou de papier. KOHN a décrit aussi une technique employant comme support l'acétate de cellulose (110), et il préconise dans ses deux techniques sur agar l'introduction d'un témoin positif pour chaque sérum, en vue de vérifier l'identité antigénique complète. Pour éviter les faux négatifs par excès d'antigène il est nécessaire d'effectuer la recherche systématiquement sur des échantillons purs et dilués (109-110-219).

La coloration n'est pas indispensable sur agar ou sur agarose , la lecture se fait aisément sur fond lumineux , mais elle augmente légèrement la sensibilité.

Certains auteurs (58-152) font apparaitre les précipités Ag-Ac par fluorescence. Après avoir soumis le sérum à tester à une IECC sur agar, l'excès de protéines est éliminé par un lavage de 48 heures dans un tampon phosphaté puis barbital. Un immunsérum anti γ globuline de lapin marqué à l'isothiocynate de fluorescéine est déposé dans les puits côté anodique et une IECC est à nouveau effectuée. Des lignes de précipitations non visibles auparavant apparaissent. L'inconvénient majeur semble la longueur de la recherche. Cette technique permet de détecter des taux de 0,5 mg/litre d'AFP. L'immunoélectrophorèse à contre courant d'ALPERT sur agarose décèle la présence de taux voisins de 0,25 mg/litre ; cette technique est donc environ 40 fois plus sensible que la DID alors que celle de KOHN ne l'est que 5 fois plus.

4-3-2-6- Méthodes radioimmunochimiques

La radioimmunochimique et la radioimmunoélectrophorèse sensibilisent les méthodes immunochimiques classiques (131).

Le procédé consiste à visualiser la réaction de précipitation dans l'agarose, invisible a des concentrations très faibles , par une molécule marquée qui est :

soit l'immunsérum anti AFP lui-même
soit une deuxième immunoglobine d'une autre espèce animale dirigée contre l'anticorps de l'immunsérum.

Dans le premier cas , comme anticorps , on utilise habituellement des gamma globulines spécifiques anti AFP marquées a l'I ^{131} . Les gamma globulines sont préparées après purification totale d'un immunsérum anti alpha foetoprotéine par immuno-absorption, à pH 7,0 avec du plasma humain normal polymérisé (9). Après contrôle de la monospécificité de l'immunsérum absorbé , les gamma-globulines sont isolées par 3 relargages successifs au sulfate d'ammonium à 0,33 de saturation et à pH 7,0. Le marquage à l'I ^{131} est réalisé a l'aide de Chloramine T en présence de KI en tampon pH 9,0. Le marquage est suivi de filtration sur Bio-gel P 30. (D'après HIRSCH-MARIE (94)). La visualisation de la réaction (Ag-Ac) est réalisée par autoradiographie de la plaque d'agarose. On arrive à déceler des concentrations voisines de 0,05 mg/litre.

L'autre procédé décrit par ROWE (176) consiste, après avoir effectué une première diffusion, à déposer un second immunsérum radioactif contre le premier utilisé. ELGORT et ABELEV (66) ajoutent dans le second temps un anticorps purifié de singe anti IgG de lapin marqué à l'I * . Cette méthode est 16 à 32 fois plus sensible que la DID.

Le Radioimmunotest utilisé par RUOSLAHTI est à la fois une technique de recherche et de dosage. Sa sensibilité extrême lui permet de détecter des traces d'AFP chez l'adulte normal comme nous l'avons dit plus haut.

4-3-2-7- Hémagglutination.

Une technique dérivant de l'hémagglutination passive a été mise au point en 1969 (158). On fixe sur des globules rouges traités , des immunoglobulines anti AFP polycondensées. L'AFP présente en très faibles quantités dans le sérum provoque l'agglutination des globules rouges. Cette méthode est 1000 fois plus sensible que l'immunodiffusion. C'est grâce à l'hémagglutination et à l'immunoautoradiographie qu'ABELEV (8) a prouvé la présence d'AFP dans le sérum des femmes enceintes et de malades atteints d'hépatitevirale. LEHMANN (122) a montré cette année que 100 % des hépato-carcinomes étaient détectés par cette technique. Toutefois il souligne que ce n'est pas uen technique de routine.

*4-3-2-8- Immunofluorescence (IF *)*

Elle consiste a conjuguer des molécules de globulines anticorps avec un fluorochrome, c'est-à-dire avec une substance émettant une lumière secondaire ou fluorescente sous l'influence d'un rayonnement d'excitation. Cette conjugaison n'empêche pas les anticorps de se fixer spécifiquement sur les antigènes correspondants. Les antigènes peuvent ainsi être repérés dans une préparation fixée telle qu'une coupe de tissu.

ENGELHARDT (68) préconise une fixation des coupes de tissu par un mélange ethanol-acide acétique, suivie d'une inclusion dans la paraffine:les préparations peuvent ainsi se conserver un an. MAWAS (138) traite des coupes de tissus fixées à l'alcool absolu et conservées par cryocongélation selon un procédé voisin. L'anticorps fluorescent est un anticorps de mouton antiglobuline de lapin. L'AFP a été mise en evidence dans les cellules parenchymateuses du foie de foetus et de nouveau-né.

* IF : Immunofluorescence : abréviation utilisée dans la suite de la thèse.

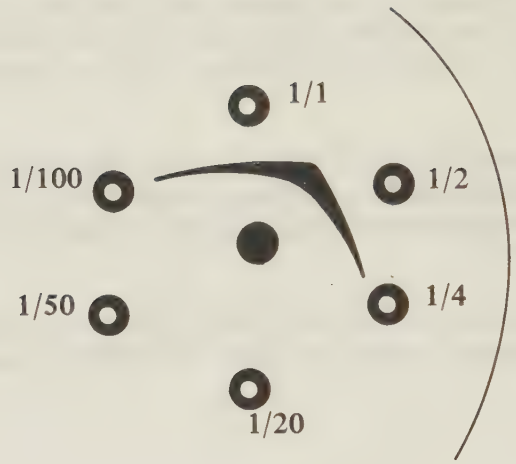


Figure 2

Sérum donnant une réaction positive à la dilution au 1/2

Antisérum

Sérum à tester

dans les cellules tumorales du cancer primitif du foie humain (89-151) ou de tératoblastomes de l'enfant. Une étude topologique récente (62) dans un cas de cirrhose infantile a permis d'identifier l'AFP non seulement dans les structures de régénération mais également dans toutes les cellules hépatiques visibles.

4-3-2-9- Agglutination au latex.

C'est la dernière technique de recherche publiée d'une part par LEHMANN (122) d'autre part par ALPERT (20). LEHMANN fait une comparaison entre 4 techniques alors qu'ALPERT compare uniquement l'immunoélectrophorèse à contre courant et l'agglutination au latex. LEHMANN admet que la réaction au latex est 6 fois plus sensible que la DID c'est-à-dire permet de détecter des taux aux environs de 2 mg/litre alors qu'ALPERT estime la sensibilité à 0,25 mg/litre. C'est une technique de routine valable. Il faut savoir toutefois que les sérums doivent être dilués systématiquement pour éviter les effets de zone et qu'il existe des réactions de fausse positivité.

4-3-2-10- Sensibilité comparée des techniques de détection.

TECHNIQUES	CONCENTRATION MINIMALE DETECTABLE en mg/litre
électrophorèse sur papier	500
électrophorèse en gel de polyacrylamide	300
double immunodiffusion en gel	5
fluoroélectroimmunodiffusion en gel	0,5
agglutination au latex	0,25
immunoélectrophorèse à contre courant	0,25
électroimmunodiffusion	0,2
immuno-autoradiographie	0,05
hémagglutination	0,005
radioimmunotest	0,002

4-4- METHODES DE DOSAGE.

Elles furent semi quantitatives jusqu'à l'obtention d'AFP pure nécessaire à la réalisation d'un standard, toutefois GITLIN (82) dès 1966 dosait de manière approximative les sérums de foetus par électrophorèse sur acétate de cellulose ; l'intégration des surfaces respectives des pics d'albumine et de l'AFP permettait d'évaluer les pourcentages de ces deux protéines. Connaissant la concentration de l'albumine, il en désuisait celle de l'AFP.

En DID, des dilutions en progression géométrique d'un sérum trouvé positif sont disposées dans les puits répartis autour du réservoir central d'antisérum. On recherche ainsi la dilution limite donnant encore un résultat positif (figure 2)

4-4-1- Techniques immunochimiques

*4-4-1-1- Immunodiffusion radiale selon MANCINI : (IDR *) (125)*

On applique les principes de la diffusion dans un milieu gélifié contenant l'anticorps. La gélification de l'agar donne lieu à la formation d'une structure micellaire, de sorte que les molécules de poids moléculaire inférieur a 200 000 diffusent librement. Les précipités Ag-Ac ont habituellement un poids moléculaire supérieur à 200 000 et ne peuvent se déplacer dans le gel.

Dans les conditions utilisées, a la température ordinaire, la quantité d'antigène diffusant à travers une surface précise d'agar est proportionnelle au temps et à la concentration de cet antigène. On remplit les puits, on laisse diffuser, on evalue le diamètre de l'anneau de diffusion. Suivant la méthode de calcul adoptée par MANCINI la surface (ou plus simplement le carré du diamètre de l'anneau de precipitation) est proportionnelle à la concentration en antigène. On trouve actuellement dans le commerce des plaques prêtes a l'emploi : elles sont préparées selon un procédé industriel bien standardisé mais on ignore généralement le titre de l'antiorps imprégnant la gélose. La préparation artisanale des gels au laboratoire permet un ajustement correct des concentrations respectives d'antisérum et d'antigène.

Le tableau 4 regroupe quelques caractéristiques de ce dosage appliqué au cas particulier de l'AFP dans les références 103-114-153.

TABLEAU 4

REFERENCES	125	103	117	114	163	153
Support	agar 1,5 %	agar 1,3 %	agarose 1 %	agarose 1,5 %	cellogel	agarose 1 %
Tampon	barbital pH 8,6	barbital pH 8,6	barbital pH 8,6	borate pH 8,6	barbital pH 8,6	pH 8,6
Temps de diffusion	quelques jours	48 h	48 h à 20°C	48 h	72 h	72 h
Lavage	NaCl -H_2O 2 à 3 jours	Tampon boraté	30 mn NaCl 30 mn H_2O	24 h NaCl 24 h H_2O	30 mn NaCl	
Coloration	noir amide	noir amide	bleu de coomassie	rouge ponceau	noir amide	noir amide
Décoloration	CH_3COOH H_2O glycérine	CH_3COOH	CH_3CH_2OH CH_3COOH H_2O	CH_3COOH	CH_3OH CH_3COOH H_2O	

Caractéristiques de l'immunodiffusion radiale

* IDR Immunodiffusion radiale : abréviation utilisée dans la suite de la thèse.

GITLIN (82) détermine des taux de 2,5 mg/litre ; KANG (103) estime la sensibilité de sa méthode à 30 mg/litre. L'immunodiffusion radiale peut être sensibilisée par trois méthodes :

- Après avoir effectué la diffusion, on étale sur le gel entre les puits un immunsérum dirigé contre l'anticorps précédemment utilisé (58), des lignes de précipitation peuvent apparaitre aussitôt entre deux puits.

- Le deuxième procédé décrit par ROWE (176) utilise un antisérum marqué à l'iode radioactif ; la sensibilité est alors de 0,05 mg/litre (46).

- Le troisième emploie une solution d'acide tannique à 1 % que l'on étend sur la surface du gel à la fin de la diffusion. Après quelques minutes, les bords des immunoprécipités apparaissent. Il est recommandé de ne pas attendre plus de 15 minutes : l'agar s'opacifie et la lecture n'est plus possible (13).

4-4-1-2- Electroimmunodiffusion de LAURELL

Cette méthode (80-115-116) associe la migration électrophorétique et la précipitation spécifique des antigènes dans un gel d'agarose contenant les anticorps correspondants (117). L'antisérum uniformément mélangé au gel est coulé sur des plaques de verre ; on découpe à l'emporte-pièces une rangée de puits dans lesquels on dépose respectivement des dilutions d'une préparation standard titrée et les échantillons à doser. On applique une tension aux extrémités de la plaque ; sous l'influence du champ électrique, l'antigène migre dans le gel. Tant que l'antigène est en excès, il reste soluble dans le gel ; au point d'équivalence, il se forme un précipité du complexe Ag-Ac sous forme d'une "fusée" dont la base est constituée par le puits. Le tableau 5 réunit les principales caractéristiques de cette technique appliquée au cas particulier de l'AFP dans les références 96-153-196.

TABLEAU 5

REFERENCES	116	96	153	196
Support	agarose à 1 %	agarose à 1 %	agarose à 1 %	agarose à 1 %
Tampon	véronal pH 8,6	véronal pH 8,6	véronal pH 8,6	véronal pH 8,6
Gel coulé à la température de	40° à 45°	45° à 50°		45°
Diamètre des puits	3 à 3,5 mm		2 mm	1,6 mm
Quantité d'Ag	10 µl	2 µl	3 µl	remplir le puits
Température de migration	+ 4°C	+ 4°C	12°C	20°C
Tension	10 V/cm	15 V/cm	8 à 10 V/cm	5,2 V/cm
Durée de migration	2 à 10 h	2 h 20 mn	5 h	2 h
Coloration	noir amide		bleu de coomassie	noir amide

Caractéristiques de l'électroimmunodiffusion

La concentration en antisérum devra être déterminée pour chaque nouveau lot d'antisérum ; en effet la hauteur des pics est inversement proportionnelle aux concentrations d'antisérum ; plus la concentration d'antisérum est faible, plus les pics sont hauts et nets. Pour qu'une mesure soit valable , il importe que la forme du pic obtenu soit celle d'un triangle isocèle à sommet très aigu. Si le sommet du pic est arrondi, émoussé, il caractérise une migration incomplète de l'Ag qui n'est pas parvenu à la zone d'équivalence Ag-Ac, la mesure devient impossible. Il convient alors soit de prolonger la durée de l'électrophorèse, soit de modifier le rapport Ag/Ac pour obtenir une image parfaite de triangle isocèle. Lorsque sur une plaque, tous les pics obtenus sont des triangles isocèles de base égale au diamètre du puits de dépôt, la hauteur de ces triangles peut être utilisée pour une mesure quantitative. En déposant pour chaque plaque 3 à 4 dilutions standards de l'antigène il est aisé de déterminer la concentration d'un antigène inconnu, en reportant la hauteur du pic correspondant sur la courbe étalon obtenue à partir des standards. La sensibilité peut être augmentée environ 20 fois en appliquant la technique de ROWE ; après la migration et un lavage, on applique un antisérum de mouton anti-lapin marqué à l'I^{125} pour révèler des précipités inapparents. On fait ensuite une auto-radiographie (196). Le seuil de détection habituel est de 0,3 mg/litre.

4-4-2- Technique radioimmunologique

Un procédé radioimmunologique (121-156-171-179-180) par dilution isotopique analogue aux méthodes de dosage des hormones telles que l'insuline, le glucagon, la TSH, a fourni la preuve de la présence d'AFP dans le sérum d'adultes sains. On marque à l'Iode^{125} de l'AFP purifiée par la méthode à la chloramine T. On élimine l'excès d'I^{125} par filtration sur gel de SEPHADEX G 25. La protéine marquée entre en compétition avec l'AFP stable du sérum pour se fixer sur un immunsérum. MASSEYEFF (134) et d'autres chercheurs (52-181) grâce à cette technique ont testé de nombreux sérums ; ils prouvent la présence d'AFP , dans le sérum des sujets normaux, dans des cirrhoses, des hépatites, et bien sûr dans des hépatomes négatifs en AFP par les techniques d'immunoprécipitation classiques.

La méthode radioimmunologique permet de titrer avec précision l'AFP a des taux de 0,005mg/litre.

V – INTERET DIAGNOSTIQUE

5-1- EN CANCEROLOGIE :

5-1-1- Cancer primitif du foie : CPF *

La découverte de l'AFP par ABELEV (1) en 1963 dans le sérum de souris adultes porteuses d'hépatomes transplantables induits par l'ortho-aminoazotoluène a permis d'associer pour la première fois la synthèse d'une protéine embryonnaire à la notion de carcinogénèse. Les travaux qui ont suivi, ont mis en évidence l'AFP au cours d'hépato-carcinomes , soit chez l'animal (99-204) soit chez l'homme (3-9-51-53-70-72-95-100-128-138-141-155-167-169-184-186-214-220) La découverte de l'AFP dans le CPF a été d'un grand intérêt pour le diagnostic de ce cancer : en effet sa présence apporte un argument confirmatif , à côté de la ponction biopsie, de la laparotomie exploratrice (195), de la scintigraphie par double marquage : l'or et a la sélénométhionine (50). Cette recherche rend les plus grands services non pas tant dans le diagnostic de l'hépatome sur foie sain que dans celui d'un cancer primitif greffé sur un foie cirrhotique.

* CPF : Cancer primitif du foie : abréviation employée dans la suite de la thèse

Jusqu'au début de l'année 1970 , tous les auteurs s'accordaient à penser que la présence d'AFP dans le sérum d'un individu adulte traduisait l'existence chez ce malade, soit d'un CPF soit d'un tératome ovarien ou testiculaire. L'AFP est retrouvée dans la proportion de 60 à 80 % selon les auteurs (Tableau 6). La fréquence de positivité des résultats n'est influencé ni par le sexe, ni chez l'adulte par l'âge du malade ; cependant les hépatomes et tératomes de l'enfant semblaient s'accompagner plus fréquemment d'une synthèse d'AFP que les tumeurs de l'adulte (139). D'autre part, la présence d'AFP était signalée plus souvent chez les malades africains porteurs d'hépatomes que chez les malades européens (34-169-172-184).

TABLEAU 6

	% CPF AFP (+)	REFERENCES
AFRIQUE		
CONGO	77	157
GHANA	72	70
KENYA	71	157
MOZAMBIQUE	68	143
SENEGAL	72	132
AFRIQUE DU SUD	78	172
OUGANDA	50	11
ETATS-UNIS	31	101
ASIE		
INDONESIE	87	112
MALAISIE	72	157
FORMOSE	93 *	15
EUROPE		
FRANCE	60	65
	59	94
	59	169
	55	214
GRANDE-BRETAGNE	40	70
GRECE	51	41
ESPAGNE	42	210
URSS	60	4

Repartition géographique du cancer primitif du foie

93 * : ce résultat a été obtenu par immunoélectrophorèse à contre courant sur agarose

Actuellement, l'amélioration des techniques utilisées a augmenté le pourcentage de positivité, au cours du CPF , dans les proportions de 31 % à 51 % chez les Caucasiens et de 75 % à 95 % à Formose (15-211) par exemple.

- les facteurs raciaux et géographiques sont évidents comme le montre le tableau 6 ;

- l'influence de l'âge est aussi évidente. Différents travaux récents le prouvent (15-23-132-139-199). Dans une population d'origine française, le test était positif chez 90 % (46) des enfants au-dessous d'un an , mais chez 70 % seulement des adultes , sans différence entre les groupes d'âge au-dessus de 20 ans (199). Aux Indes, l'AFP est présente dans le sérum de 60 % des CPF entre 30 et 40 ans ; dans 22 % chez les sujets plus âgés (23).

- Des etudes montrent une différence significative entre les deux sexes (Tableau 7).

TABLEAU 7

HOMME	FEMME	REFERENCES
45 %	20 %	101
90 %	64 %	113
75,9 %	56,3 %	133
78,2 %	71,7 %	184

Pourcentage de positivité de l'AFP dans le CPF en fonction du sexe

- La fréquence d'apparition varie surtout suivant le type histologique de la tumeur. Il s'agit dans la grande majorité des cas d'hépatome hépatocellulaire , beaucoup plus rarement d'hépatocholangiome (3), jamais de cholangiome pur. Quelques cas d'hépatoblastomes ont été publiés (14-138). ECONOPOULOS (65) pense que l'AFP est le plus souvent négative dans les cancers bien différenciés , alors que les résultats d'auteurs chercheurs (15-64-172) sont opposés.

- Les corrélations entre le taux d'AFP et les caractères de la tumeur sont diversement rapportés. Chez la souris et le rat la concentration est d'autant plus forte que la croissance de la tumeur est plus rapide (7-105). Chez l'homme, au contraire, il y a pas de relation évidente entre la croissance de la tumeur et l'évolution de la concentration dans le sérum. Certains ne trouvent pas de relation entre le poids du foie et la concentration de l'AFP (70-172) alors qu'ALPERT (15), SANKALE (184) et MASSEYEFF (135) constatent que les fortes concentrations sont d'autant plus fréquentes que le foie est gros.

- Dans les cas positifs, le taux sérique d'AFP varie dans de larges limites ; dans la statistique de PURVES par exemple, il varie de 1,5 à 7 100 mg/litre et dans la majorité des publications (78-172-183) de 10 à plusieurs milliers de mg/litre.

- La synthèse semble apparaître dès le stade initial de la croissance tumorale chez l'animal HULL (99) trouve une réaction positive chez des singes porteurs d'un hépatome induit, avant que la tumeur ne soit palpable. Chez le babouin privé de pyridoxine, l'AFP apparait à un stade prénéoplasique (71). Chez le rat, au cours de cancers induits, l'AFP est détecté au bout d'un mois avant que le cancer ne doit décelable. Chez l'homme, l'AFP semble apparaître beaucoup plus tard en général. Toutefois, ABELEV (7) a rapporté un cas de réaction positive un an avant la découverte du cancer et récemment, LEBLANC a publié une étude de 6 cas d'hépatomes suivis régulièrement sur le plan clinique et biologique. Trois cas furent diagnostiqués par l'examen clinique, l'AFP n'apparut que plus tard. Pour trois autres, au contraire, le premier indice fut la présence d'AFP chez les sujets en bonne santé apparente. Tous décèdèrent en quelques mois (118).

Les méthodes de plus en plus sensibles dépistant un nombre important d'affections du foie autres que l'hépatome limitent l'utilité diagnostique de cette recherche. Toutefois, le pourcentage d'hépatomes (AFP positif) étant si élevé , ce test garde tout son intérêt (74-135-155-187). On peut même dire que cette recherche est une méthode de dépistage. HIRSCH-MARIE et HUGUET citent deux cas pour lesquels une hépatectomie a été faite avec succès dès la découverte de l'AFP (97). L'étude quantitative présente un intérêt dans la surveillance de l'évolution du CPF : cette protéine disparait après ablation de la tumeur (136-200) et réapparait au cours des récidives. Des etudes particulièrement intéressantes ont eté faites a la suite de transplantation ou de désartérialisation hépatique (17-98).

5-1-2- Dysembryomes malins :

Parmi les affections extrahépatiques , l'AFP sérique a été trouvée avec une grande fréquence au cours des tératomes et des cancers à cellules germinales.

ABELEV (3) puis MASOPUST (128) , HULL (101) signalent l'existence d'AFP dans le sérum d'enfants atteints de tératomes malins soit génitaux (testiculaires ou ovariens) (123) soit extra-génitaux. Le pourcentage de positivité dépasse toujours 50 % chez l'enfant (69-139-199), chez l'adulte la positivité du test est plus faible de l'ordre de 20 % au cours de tératoblastomes testiculaires (36-37) ou de dysembryomes ovariens (224). Dans cette étude systématique , ABELEV et ses collaborateurs montrent que la fréquence des tests positifs varie largement suivant la nature de la tumeur : 41 % des 17 cas de tératoblastome de type cancer embryonnaire , 12 % des 8 cas de tératoblastome de type séminome ou chorion epithélioma , 50 % des 4 malades avec tératoblastome. En revanche, aucune réaction positive n'a eté observée dans les 12 cas de séminome, dans 4 cas de chorion épithélioma, dans 12 cas de tumeur à cellule de stroma.

Actuellement grâce à la technique d'hémagglutination, ABELEV (8) a trouvé la présence d'AFP dans deux séminomes sur sept, 10 chorion-épithéliomas sur 18. D'autre part, KAHAN et LEVINE (102) ont montré qu'un tératome primaire bien différencié ne produit pas d'AFP alors que 100 % des tératomes transplantables à cellules tumorales indifférenciées ou embryonnaires synthétisent la protéine foetale.

MAWAS (140), BOURGEAUX (37) et leurs collaborateurs ont souligné tout l'intérêt diagnostique et surtout pronostique de l'étude de l'AFP dans ces tumeurs beaucoup plus accessibles à un traitement chirurgical que le CPF. Une donnée quantitative est ici très importante ; en effet sous chimiothérapie, on doit assister à une chute de la concentration sérique (108), de même après exérèse chirurgicale, la réaction doit se négativer totalement en 3 semaines. MAWAS cite un cas pour lequel la réaction préalablement positive est devenue négative 18 jours après. La réapparition de la protéine fera penser à une aggravation de la maladie, par formation de métastases. Aussi des examens répétés, qualitatifs et quantitatifs sont très utiles tant dans l'établissement du diagnostic que dans la surveillance thérapeutique et chirurgicale. Il est apparu donc indispensable de faire entrer cet examen dans le bilan biologique de toute tumeur testiculaire.

5-1-3- Autres tumeurs :

Grâce aux techniques classiques d'immunodiffusion, on a mis en évidence l'AFP dans divers autres cancers :

– des cancers secondaires du foie,

d'origine
- gastrique (16-31-32-39-61-77-78-94-106-111-142-149-157-182-185)
- oesophagienne (223)
- pancréatique et excrétobillaire (22-31-32-157)
- colique (22)
- bronchopulmonaire (57-81-94)
- indéterminée (36-81-157)

– des cancers primaires sans métastase hépatique
- tumeur cardiotubérositaire (32)
- cancer de la vésicule biliaire (33)
- hypernéphrome (162)

Grâce à l'hémagglutination , ABELEV (8) détecte l'AFP dans :
- 7 néphroblastomes sur 17
- 9 tumeurs métastasiques du foie sur 23
- 8 autres tumeurs sur 31.

ABELEV (7) pense que dans les cas de cancers secondaires du foie, il est très peu probable que la tumeur primitive soit à l'origine de l'AFP. Il explique sa présence par des phénomènes de nécrose et de régénération intra-hépatique. Les taux sériques sont très variables. Un taux de 1200 mg/l a été trouvé chez un malade suivi par MEHLMAN (142) . KOZOWER (111) envisage deux sources possibles d'AFP chez ces malades : soit les hépatocytes au stade de régénération autour des noyaux métastatiques, soit les métastases adéno-cancéreuses elles-mêmes. Cette dernière hypothèse est corroborée par ces trois cas de cancers primaires sans métastase et la négativité de la recherche pendant 255 jours après la cholécystectomie faite dans le cas du cancer de la vésicule biliaire.

5-2- HEPATOPATHIES NON CANCEREUSES :

5-2-1- Hépatites :

ALPERT et ses collaborateurs (9) ont les premiers cité le cas d'une hépatite accompagnée de la présence d'AFP. Beaucoup d'autres publications ont suivi (7-36-61-76-79-81-112-182-185-200-205).

Chez l'adulte , grâce aux techniques plus sensibles , GEFFROY (78-79) a trouvé une réaction positive dans 18 hépatites virales sur les 22 étudiées. Utilisant l'immunoradiographie, ABELEV et ses collaborateurs trouvent le test positif dans 12 % et par hémagglutination dans 71 % des cas. Des études chez l'enfant de moins d'un an (103-128-131) par des techniques immunochimiques classiques, montrent un pourcentage bien plus élevé que chez l'adulte : 30 % (46). Il est démontré aussi que sa présence est cons-

tante dans l'hyperbilirubinémie du nouveau-né.

Dans tous les cas d'hépatites (AFP positive), sa présence n'est que transitoire, en général quelques semaines ; sa présence coïncide toujours avec une phase de régénération intense du parenchyme hépatique. Les taux sont souvent plus faibles que ceux observés dans les hépatomes et les tératomes.

5-2-2- Hémochromatoses :

Quelques cas d'hémochromatoses (38-40-78) ont été accompagnés transitoirement d'AFP ; les malades ont pu être suivis plusieurs mois, le diagnostic d'hépatome étant exclu par des examens comprenant une laparoscopie exploratrice, une biopsie hépatique etc . . .

5-2-3- Cirrhoses :

Chez l'adulte : c'est seulement grâce aux techniques d'immunoradiochimie qu'ABELEV a détecté la présence d'AFP dans des cirrhoses éthyliques. Les taux sont légèrement plus élevés que chez un adulte sain. Il sont situés (181) entre 0,05 mg/ et 0,1 mg/litre , alors qu'un sujet sain a un taux inférieur à 0,025 mg/litre.

Chez l'enfant : les cirrhoses de l'enfant seront étudiées parmi les maladies métaboliques.

5-2-4- Stéatose hépatique :

On a noté l'existence passagère (38) d'AFP dans le sérum d'un homme porteur d'une stéatose avec importants signes de régénération hépatique.

5-2-5- Ataxie-télangectasie :

En 1972, WALDMANN et Mc INTIRE ont observé chez 9 de leur 20 patients atteints de cette maladie , la présence d'AFP. Les taux trouvés se situaient entre 0,044 et 2,8 mg/litre. La plupart furent détectés par radioimmunochimie, certains par DID. Sa présence peut être expliquée par le développement insuffisant du foie chez ces sujets et par un défaut de différenciation cellulaire hépatique (222).

5-3- EN GENETIQUE :

Maladies métaboliques de l'enfant :

L'AFP apparait dans les cirrhoses infantiles que ce soit les cirrhoses indiennes rapportées par NAYAK (144) ou la tyrosinose héréditaire (25-26-27-45-46-63). Ces auteurs notent la grande fréquence de l'AFP dans la tyrosinémie chez des enfants dont l'âge maximum est trois ans. Les taux qui excèdent souvent et largement ceux enregistrés dans la sang du cordon des nouveaux-nés permettent de distinguer cette néoproduction de celle des hépatopathies du nourrisson (128). Des études (26-27) histologiques montrent qu'il existe une relation directe entre la phase régénérative et cirrhotique du foie tyrosinémique

et les taux d'AFP en circulation. D'autre part, les auteurs émettent l'hypothèse d'un phénomène inducteur inhérent à la tyrosinémie, ajouté au processus de la régénérescence hépatique. La nature d'un tel phénomène est discutée et reliée le plus probablement au déséquilibre intra-cellulaire des acides aminés. BUFFE (46) a pu observer chez un de ses malades que le taux maximum est apparu après une hyperméthioninémie et hypercystinémie importante. L'instauration d'un régime diététique approprié a eté suivie d'une décroissance du taux d'AFP sérique. Une étude topologique en immunofluorescence (61) dans un cas de cirrhose pigmentaire infantile lié vraisemblablement à un trouble congénital d'un acide aminé permet de penser aussi que le trouble métabolique congénital est présent dans la vie intra-utérine et que la synthèse d'AFP persiste après la naissance.

La foetoprotéine dans la tyrosinémie peut fournir une approche pour la localisation du ou des gènes qui règlent la synthèse de l'AFP et déterminent la maladie.

5-4- EN OBSTETRIQUE :

De nombreux auteurs se sont attachés à montrer la signification de taux élevé d'AFP au cours de la grossesse tant dans le sérum de la femme enceinte que dans le liquide amniotique (44-56-91-189-191-194). La détermination du taux sérique du sang de cordon (73-114) permet de différencier un vrai prématuré d'un enfant né juste avant terme. Les concentrations foetales sériques sont 300 à 600 fois plus élevées que les concentrations maternelles. Le taux sérique maternel d'AFP augmente de 60 % en cas de détresse foetale ou de mort intra-utérine. Des taux atteignant 380 mg/litre sont observés dans le liquide amniotique pour des foetus anencéphales ou porteurs de spina bifida alors que les taux normaux sont de 15,5 mg/litre.

- SEPPALA et RUOSLAHTI (194) ont tenté de trouver une relation entre les taux d'AFP et l'état du foetus :

  - des taux élevés d'AFP dans le sérum maternel et le liquide amniotique s'observent dans les cas de mort intra-utérine et de détresse foetale chronique.

  - des taux sériques élevés et un liquide amniotique normal laissent prévoir une transfusion foeto-maternelle.

  - un taux sérique normal et une concentration élevée dans le liquide amniotique sont le signe de détresses foetales aigues et récentes, de méningomyolocèles ou d'hydrocéphalies.

SEPPALA (192) recherche l'AFP sérique maternelle pour confirmer ou infirmer le diagnostic d'un chorion-épithélioma ou d'un mole hydatiforme. Les techniques sensibles radioimmunochimiques sont d'un grand intérêt dans les complications de la grossesse.

TRAVAUX PERSONNELS

I – ETUDE ANALYTIQUE

1-1- TECHNIQUES DE RECHERCHE

Nous avons utilisé cinq méthodes de recherche de l'AFP dans le sérum, les liquides de ponctions, les broyats de tumeur. Disposant de 627 échantillons , nous avons fait une étude comparative de la sensibilité de trois d'entre elles (42).

– **la double immunodiffusion** classiquement employée,
– une technique d'**immunoélectrophorèse à contre courant** sur Agarose,
– une troisième technique sur laquelle a porté tout particulièrement notre travail, l'**immunoélectrophorèse à contre courant sur Cellogel**. Nous avons en outre testé quelques échantillons par une **technique au Latex** et effectué quelques recherches par **électrophorèse sur gel de polyacrylamide**.

Ces techniques sont décrites telles que nous les employons ou les avons employées.

1-1-1- Technique de double diffusion en gel d'agarose : DID

♦ **Principe** : la diffusion de l'antigène et de l'anticorps correspondant s'effectue au sein d'un gel d'agarose : une réaction positive se traduit par l'existence d'un seul arc de précipitation.
C'est la méthode d'OUTCHERLONY.

♦ **Réactifs :**

Tampon Véronal pH 8,6

– Acide diéthylbarbiturique	1,84 g
– Diéthylbarbiturate de sodium	10,30 g
– Eau distillée qsp	1000 ml

Ajuster à pH 8,6 à l'aide de NaOH N
Conserver à + 4°C.

Préparation du gel :

– Gel à 3 %	Agarose *	3	g
	Eau distillée	100	ml

Faire chauffer sur la grille d'un bec Bunsen en agitant jusqu'à éclaircissement. Ajouter 10 gouttes de Merseptyl.
Stocker le mélange dans des tubes à essais à + 4°C.

* INDUBIOSE A 37. L'Industrie Biologique Française - 35 quai du Moulin de Cage 92 GENNEVILLIERS

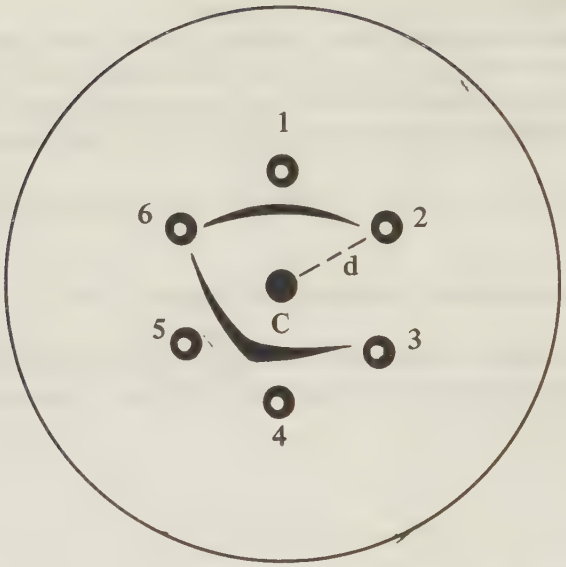


Figure 3

Double immunodiffusion en gel.
Le puits central C reçoit 10 µl d'antisérum ; le puits n° 1 10 µl de sérum contrôle positif ; les puits n° 2 à 6, 10 µl de chacun des sérums à tester. En 1, nous avons une réaction témoin positive ; en 2-3-6 , des réactions négatives ; en 4-5 , des réactions positives.

– Gel d'agarose tamponnée :

+ Au moment de l'emploi, faire chauffer l'agarose à 3 % au bain marie bouillant et mélanger dans les proportions suivantes :

Eau distillée	1 partie
Tampon pH 8,6	2 parties
Agarose 3 %	3 parties

+ laisser l'erlenmeyer dans un bain d'eau chaude et répartir 6,8 ml dans les boites de Petri posées sur une surface parfaitement plane, laisser gélifier, stocker dans un récipient à + 4°C.

Echantillons :

+ les sérums et les liquides de ponction doivent être séparés des globules par centrifugation le plus tôt possible et congelés jusqu'à utilisation.

+ les pièces anatomiques (fragments de foie) sont congelées immédiatement après le prélèvement. Un fragment de 25 mg est découpé, broyé dans un ml de tampon Véronal. Après une centrifugation rapide, le surnageant est utilisé pour la recherche.

Immunsérum :

Coffret REX BEHRINGWERKE comprenant :

- un antisérum de lapin (1 ml)
- sérum de contrôle positif (0,5 ml).

♦ **Mode opératoire :**

A l'aide d'un emporte-pièces (diamètre intérieur 3 mm) creuser des puits dans l'agarose suivant la figure 3.

Mettre la boite sous une cloche de verre en atmosphère humide. Laisser diffuser 24 heures.

♦ **Lecture :**

Elle s'effectue sur fond noir ou sur fond lumineux : une réaction positive se traduit par un trait horizontal de précipitation situé à mi-distance entre le puits central et les puits périphériques (figure 3).

Si la réaction est négative , ajouter 10 μl de sérum, lire 8 à 9 heures plus tard.

Si les sérums testés sont encore négatifs, ajouter à nouveau 10 μl de sérum dans les puits.

1-1-2- Immunoélectrophorèse à contre courant sur Cellogel.

♦ **Principe** : C'est le principe de l'électrophorèse en sens opposé. Dans les conditions utilisées, l'AFP se déplace vers l'anode comme une globuline alpha 1 tandis que l'anticorps tend à gagner la cathode. Lorsque l'antigène et l'anticorps se rencontrent, une ligne de précipitation apparait.

♦ **Réactifs et matériel :**

Bande Cellogel CHEMETRON 5,7 x 14 cm pour 6 ou 7 déterminations.

NaCl à 9 g/litre.

Tampon : Véronal sodique	8,24	g/l
Colorant : bleu de Coomassie	0,5	g

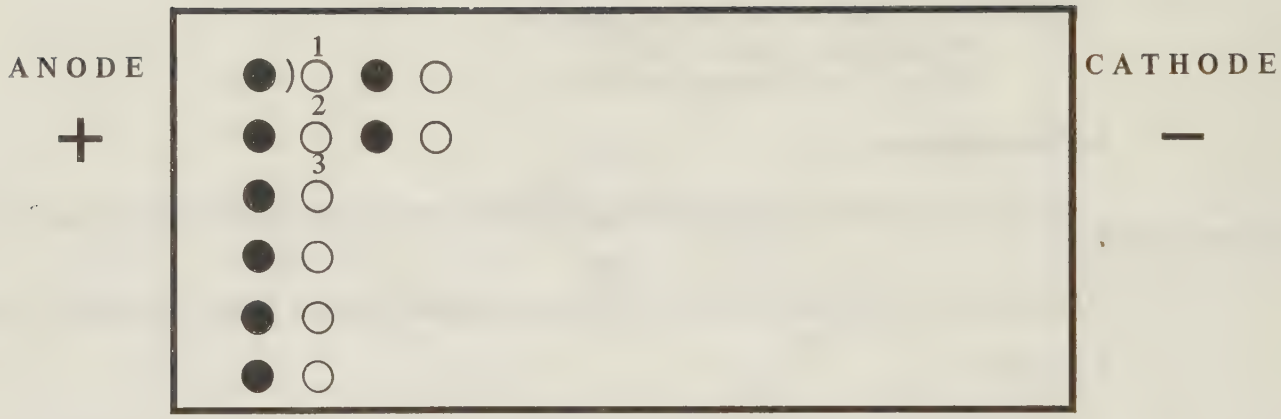


Figure 4

Immunoélectrophorèse à contre courant sur agarose
- ● Antisérum
- ○ en 1 Sérum positif Témoin
- ○ en 2-3 etc . . . Echantillons à analyser

	Méthanol	45	ml
	Eau	45	ml
	Acide acétique	10	ml
Décolorant :	Méthanol	450	ml
	Eau	450	ml
	Acide acétique	100	ml

Echantillons (voir DID)

Immunsérum (voir DID)

◆ **Technique** : Immerger les bandes de Cellogel dans le tampon pendant 15 minutes minimum. Sécher légèrement entre deux feuilles de papier filtre et tendre la membrane sur le portoir, face absorbante à la partie supérieure.

Déposer sous forme de goutte, à l'aide d'une micropipette EPPENDORF 5 µl d'immunsérum au centre de la bande. Vis à vis de l'immunsérum. à environ 12 mm, déposer du côté cathodique le sérum à analyser. Mettre sous tension 200 Volts pendant 30 minutes.

Rinçer dans du sérum physiologique pendant 2 heures sur un agitateur mécanique circulaire en changeant le bain toutes les 1/2 heures.

Coloration au bleu de Coomassie pendant 15 minutes, décoloration en 3 bains successifs.

◆ **Lecture** : la présence d'AFP est révélée par un arc bleu situé à mi-distance des 2 dépôts (photographie n° 1).

1-1-3- Immunoélectrophorèse à contre courant en gel d'agarose *

◆ **Réactifs et matériel** :

Plaques de verre 8 x 20 cm

Tampon Véronal pH 8,6 (voir DID)

Préparation du gel (voir DID)

Répartir immédiatement 20 ml de la solution chaude obtenue sur une plaque de verre posée sur une table à niveau.

Laisser gélifier 5 minutes à la température ordinaire et stocker à + 4°C.

Couler cette même solution sur des morceaux de gaze.

Laisser gélifier pour obtenir des ponts qui permettront le contact entre le tampon de migration et la surface du gel. Les conserver dans du tampon.

Immunsérum (voir DID)

◆ **Mode opératoire** :

A l'aide d'un emporte-pièces (diamètre intérieur de 4 mm) creuser des puits dans l'agarose suivant la figure 4.

* Cette technique est celle utilisée pour la détection de l'Antigène Australia. Nous l'avons pratiquée à la Faculté de Médecine de Lyon dans le laboratoire du Professeur THIVOLET que nous remercions de son accueil bienveillant.

Photographie n^{o} 1

IMMUNOELECTROPHORESE A CONTRE COURANT SUR CELLOGEL

ligne du haut, de gauche à droite :
- Un liquide d'ascite (5 μl)
- 5 échantillons de sérums (5 μl)

ligne du bas :
- Antisérum anti alpha foetoprotéine.

/Arc de précipitation Ag-Ac prouvant la présence d'AFP dans le sérum correspondant.

Chaque rangée de puits est remplie à l'aide d'un tube capillaire soit par l'anticorps, soit par les sérums à analyser.

Poser la plaque sur le chevalet d'une cuve à électrophorèse (sérum côté cathodique, antisérum côté anodique).

Poser un pont à chaque extrémité de la plaque d'agarose.

Mettre sous tension 1,2 à 1,3 V/cm soit 25 à 30 mA pendant 60 minutes.

◆ **Lecture :**

Laisser reposer la plaque environ 60 minutes. La lecture s'effectue sur fond lumineux. Une ligne de précipitation entre deux puits adjacents d'anticorps et d'antigène indique la présence d'AFP. Il est nécessaire d'introduire un témoin dans chaque plaque.

1-1-4 Avantages et inconvénients respectifs de chaque technique :

TABLEAU 8

	DID	IECC	
		Agarose	Cellogel
Appareillage	Boite de Petri	Générateur de courant 0-500 V. cuve GELMAN	Générateur de courant 0-500 V. cuve CHEMETRON tank type 2 PAC/5
Support : Nature Conservation :	Gel d'agarose plusieurs semaines	Gel d'agarose 4 jours	Cellogel illimitée
Durée de manipulation	1/2 h	2 h	1 h
Délai de réponse	3 jours	1/2 journée	1/2 journée
Nombre de recherches	5 par boite	75 par plaque	21 par cuve

Etude comparée des trois techniques d'Immuno-précipitation

L'IECC sur Cellogel offre l'énorme avantage d'avoir un support "prêt à l'emploi", stable et maniable, d'apporter un gain de temps et d'être moins couteuse que l'IECC sur agarose.

1-1-5- Technique au Latex

Le réactif au Latex a été mis obligeamment à notre disposition par les laboratoires BEHRING (Docteur BENDNER, MARBURG/Lahn). Il s'agit de particules de latex-polystyrol unies par une liaison covalente à une gamma-globuline spécifique anti alpha foetoprotéine.

♦ **Technique :**

Poser une lame de verre très propre sur un fond noir avec une lumière blanche latérale. Déposer 20 µl de sérum (3 sérums par lame).
Ajouter une goutte de réactif. Mélanger avec un tube à fond rond et déclencher un chronomètre. Lire la réaction à 5 minutes exactement. Une agglutination traduit une réaction positive. Les sérums ayant été trouvés positifs en immunodiffusion sont testés purs et dilués au 1/10 dans du sérum physiologique.

1-1-6- électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Nous allons décrire succinctement les étapes principales de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique de ORNSTEIN et DAVIS (59-159) : il s'agit de la "Disc-électrophoresis".

♦ **Principe :**

Le haut pouvoir résolutif de cette méthode est dû au fait que trois effets s'additionnent.

– séparation des protéines suivant leur charge électrique, comme dans l'électrophorèse sur papier ou sur acétate de cellulose.

– effet de tamisage moléculaire séparant les protéines suivant leur taille donc leur poids moléculaire.

– effet de concentration : les protéines s'empilent en un disque extrêmement fin de concentration très élevée (effet KOHLRAUSCH) ce qui permet de traiter des liquides à faible concentration protéique.

La migration s'effectue dans des tubes de verre cylindriques dans lesquels sont coulés trois gels successifs :

- un gel échantillon ou "LARGE PORE" de concentration égale à 3 % ,
- un gel d'espacement ou "SPACER-GEL" constitué de gel "LARGE PORE" ,
- un gel de séparation où s'effectue la migration électrophorétique. La concentration de ce gel est 7,2 %.

La polymérisation est réalisée entre un monomère , l'acrylamide $CH_2 = CH - CO - NH_2$ et le bisacrylamide $CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH = CH_2$. Il existe des proportions à respecter entre les concentrations d'acrylamide et de bisacrylamide. Elle s'effectue sous l'effet de rayons UV ou d'agents chimiques fournisseurs de radicaux libres, inducteurs de polymérisation tels que riboflavine , persulfate d'ammonium ou TEMED (N , N , N' , N' , tetraméthylènediamine).

♦ **Technique :**

◇ **Préparation de l'électrophorèse**

Sur une prise d'essai de quinze microlitres , le sérum est mélangé à une quantité définie de préparation "Large Pore" et introduit dans le tube de verre, la polymérisation a lieu après 20 minutes d'exposition à la lumière d'une lampe riche en UV.

Après lavage , le deuxième gel "Large Pore" est alors introduit seul et polymérisé dans les mêmes conditions.

Enfin, le gel de séparation "Small Pore" remplit le reste du tube et se polymérise après une heure à l'obscurité. Le sérum qui s'est concentré selon un front rectiligne et homogène au niveau du gel de séparation, est alors prêt à migrer.

◇ **L'électrophorèse**

Les tubes de verre sont introduits verticalement (le sérum est en haut) dans une cuve spéciale contenant un tampon tris-glycine de pH = 8,3. L'intensité du courant de migration est fonction du nombre de sérums á étudier (environ cinq milliampères par gel) la migration dure 45 minutes, on suit sa progression en introduisant au départ, au sommet de la cuve, quelques gouttes de bleu de bromophénol dans le tampon Tris. Ce colorant visualise l'albumine , en l'occurence le front de migration.

◇ **Coloration**

Les gels sont retirés de leurs tubes de verre et plongés durant trente minutes dans l'amidoschwarz.

◇ **Décoloration**

Elle s'effectue dans le dispositif "quick-gel Destainer CANALCO pendant 20 minutes par dialyse contre une solution d'acide acétique à 7 % . Si on ne possède pas ce dispositif on peut plonger les gels dans l'acide acétique à 7 % en renouvelant souvent les bains de lavage. La décoloration complète exige plusieurs jours.

◇ **Intégration des électrophorèses**

Les gels sont introduits grâce à un porte-échantillons dans un appareil intégrateur CHROMOSCAN. La lecture se fait en lumière rouge (620 nm) et l'appareil met en evidence sur un tracé les pourcentages respectifs des différentes fractions. Ceux-ci sont ensuite transformés en valeurs absolues (grammes par litre). L'intégration "au ralenti" permet de mieux séparer sur le tracé le pic de l'AFP de celui de l'albumine. La durée totale de l'électrophorèse est d'environ quatre heures, mais sa réalisation bien que minutieuse est parfaitement standardisée. Les gels colorés et intégrés, peuvent se conserver très longtemps dans l'eau distillée.

1-2- ETUDE DE LA SENSIBILITE DES TECHNIQUES DE RECHERCHE

1-2-1- Sensibilité comparée de la DID , IECC sur Agarose et sur Cellogel.

Nous avons dosé l'AFP de 12 sérums positifs par la technique de Laurell et de Mancini, (les taux varient de 0,95 mg/l à 580 mg/l) et déterminé la dilution limite pour laquelle la recherche était encore positive en DID (1 seul dépôt) et en IECC. La valeur moyenne des seuils de détection (exprimés en mg/litre) pour ces 12 sérums donne une bonne approximation de la sensibilité de chacune des techniques. Chaque valeur peut être soumise à variation en fonction du titre de l'antisérum utilisé (tableau 9).

TABLEAU 9

Taux AFP MG/L	DID		IECC Agarose		IECC Cellogel	
	Dilution limite	Seuil de détection	Dilution limite	Seuil de détection	Dilution limite	Seuil de détection
0,95		0	1/2	0,47	1/4	0,23
1,5		0	1/2	0,75	1/8	0,18
2,3		0	1/4	0,57	1/8	0,28
2,6		0	1/4	0,65	1/16	0,16
2,7		0	1/4	0,67	1/16	0,16
22	1/2	11	1/32	0,68	1/64	0,34
60	1/5	12	1/128	0,46	1/256	0,23
104	1/4	26	1/128	0,81	1/512	0,20
220	1/32	7	1/256	0,85	1/1024	0,21
290	QI		1/522	0,56	1/1024	0,28
410	1/64	6,4	1/1024	0,40	1/2048	0,20
580	1/64	9	1/1024	0,56	1/2048	0,28
Valeur moyenne mg/litre		11		0,60		0,23

Sensibilité des techniques de détection par immunoprécipitation de l'AFP

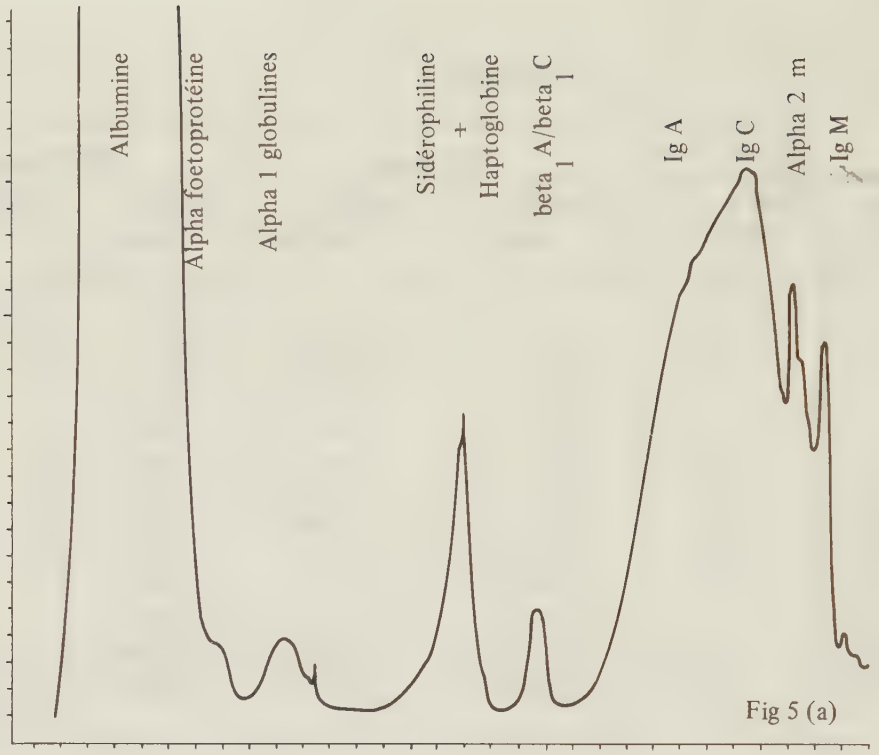
La DID en gel d'agarose après une seule application de sérum permet de déceler des taux supérieurs à 10 mg/l ; avec deux applications supplémentaires la limite s'abaisse à 3 mg/l. Suivant notre protocole, le seuil de détection de l'IECC sur agarose est de 0,60 mg/l ; on pourrait augmenter la sensibilité en effectuant un lavage, puis une coloration ; sur cellogel , des taux de 0,20 mg/l sont encore détectables.

En d'autres termes, l'IECC sur agarose est 16 fois plus sensible que la DID alors que l'IECC sur cellogel l'est environ 43 fois plus. Evitant l'inconvénient majeur qu'est le phénomène de zone, la DID garde tout son intérêt pour détecter des taux élevés ; c'est pourquoi en pratique journalière , pour chaque sérum, ou liquide d'épanchement, nous effectuons une recherche en DID en 12 heures et pour la mise en évidence des taux faibles une recherche par IECC sur cellogel.

1-2-2- Etude comparative de la sensibilité des 3 techniques précédentes et de celle au latex.

Cette étude n'a porté que sur 92 sérums pour lesquels la recherche d'AFP s'était avérée positive ou négative par une ou plusieurs techniques immunochimiques.

Le tableau 10 regroupe les résultats.



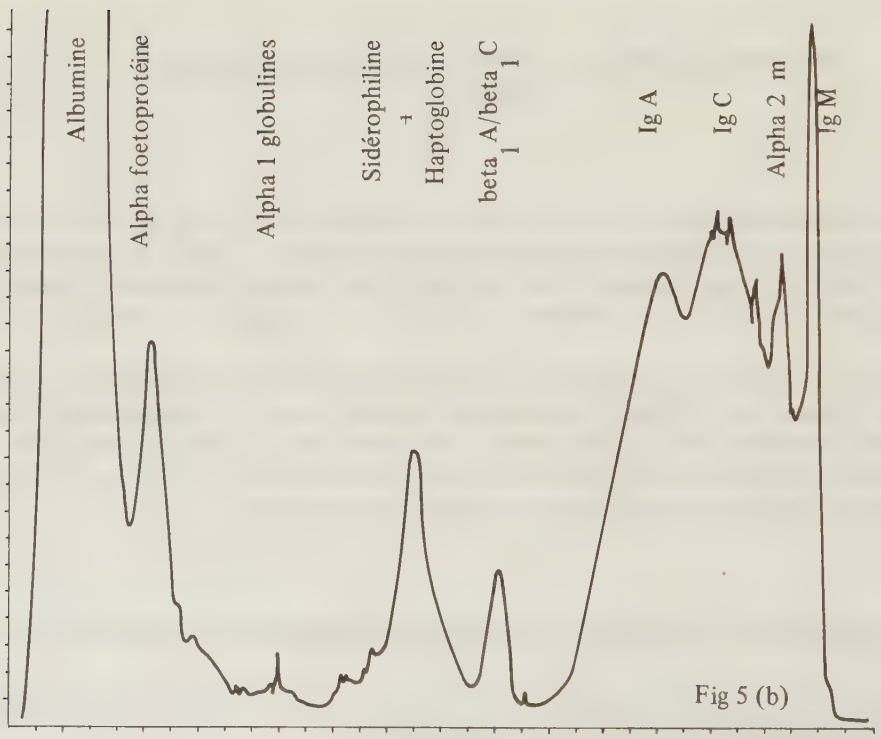


Figure 5

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

– Tracé a : sérum contenant 410 mg/litre d'AFP.

– Tracé b : sérum contenant 2 800 mg/litre d'AFP.

TABLEAU 10

NOMBRE DE RECHERCHES (sérum ou ascite)	NOMBRE DE RECHERCHES POSITIVES PAR			
	DID	IECC agarose	IECC cellogel	LATEX
55	0	0	0	0
3	0	0	0	3
19	0	0	19 (+ faible)	0
15	14	15	15	15
92	**14**	**15**	**24**	**18**

Il apparait que la technique au latex est nettement moins sensible que l'IECC sur cellogel. Nos résultats concordent avec ceux d'AI pert qui estime que l'agglutination au latex est aussi sensible que l'IECC sur agarose (20). Elle ne s'est révélée plus sensible que la DID que pour un seul sérum. Il faut noter que nous avons eu trois faux positifs correspondant à des malades présentant une réaction de Waaler-Rose positive. Cette agglutination non spécifique est facile à distinguer de celle due à la présence d'AFP . elle est quasi instantanée dès le mélange du réactif et du sérum ; elle est par ailleurs massive.

Par cette technique 8 sérums compris parmi les 14 ayant donné un résultat positif en DID ont conduit au phénomène de zone par excès d'antigène : la réaction négative sur sérum pur est apparue positive sur une dilution au 1/10. Les taux d'AFP de ces sérums étaient compris entre 40 et 470 mg/litre. Pour éviter un tel inconvénient , il est recommandé de conduire la réaction au latex simultanément sur sérum pur et dilué au 1/10. F.G. et D. LEHMANN (159) lors d'une comparaison des techniques qualitatives et quantitatives employées couramment, citent notamment l'agglutination au latex ; ils ont déterminé un effet de prozone pour une concentration supérieure à 100 mg/litre ; ils ont également constaté des réactions faussement positives dans les maladies autoimmunes et dans le sérum de malades où l'on trouve la présence du facteur rhumatoïde et de certains médicaments.

1-2-3- Seuil de détection de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Cette technique ne permet de détecter que des taux d'AFP relativement elevés. A un taux supérieur a 500 mg/litre, l'AFP apparait sous forme d'une bande proche de l'albumine , située en avant de la zone des alpha 1 globulines ; il s'agit donc bien d'une alpha 1 globuline rapide. Sur le tracé d'enregistrement , un léger renflement situé à la base droite du pic d'albumine et plus ou moins bien individualisé est visible pour un taux voisin de 200 mg/litre. Les tracés d'électrophorèse n° 5 a et b sur lesquels les pics d'AFP sont nettement décelables correspondent á deux sérums dont les taux respectifs en AFP sont de 400 mg et 2800 mg/litre.

Nous avons aussi efffectué une électrophorèse sur un broyat de tumeur. Le taux d'albumine etant nettement inférieur à celui d'un sérum, le pic correspondant sur le tracé electrophorétique est apparu entièrement et celui de l'AFP est de ce fait mieux différencié.

Nous avons déterminé la limite de la sensibilité en diluant progressivement deux sérums de taux connu. (tableau 11).

TABLEAU 11

TAUX D'AFP en mg/litre	DILUTION	PIC D'AFP sur le tracé électrophorétique
450	pur	visible
336	3/4	visible
225	1/2	visible
137	1/4	non visible
56	1/8	non visible
1060	pur	visible
530	1/2	visible
353	1/3	visible
212	1/5	visible
132	1/8	non visible

Dilutions limites montrant un pic d'AFP en électrophorèse en gel de polyacrylamide

Les seuils de détection se situèrent les deux fois aux environs de 200 mg/litre. Ce n'est pas une technique sensible ; elle peut permettre à une personne expérimentée et avertie de suspecter et signaler la présence d'AFP. D'autre part, le clinicien en présence d'un tracé évoquant une cirrhose et d'un pic d'AFP peut dire que cette cirrhose évolue vers un processus de cancérisation.

1-3- TECHNIQUES DE DOSAGES

1-3-1- Immunodiffusion radiale selon la technique de MANCINI : IDR

♦ **Principe :**

Un volume connu d'échantillon est déposé dans les puits ; après diffusion de 48 heures à température ambiante on évalue le diamètre de l'anneau de diffusion.

♦ **Réactifs :**

Standard alpha Foetoprotéine *.
C'est un sérum humain liquide, contenant de l'AFP. Il est stabilisé selon un procédé spécial. Sa concentration en AFP est 220 mg/litre actuellement.

M-Partigen Alpha Foetoprotéine **
Ce sont des plaques prêtes à l'emploi comprenant : un gel d'agarose dans lequel est incorporé l'antisérum spécifique anti-alpha 1 foetoprotéine et un agent de conservation . azide de sodium (1 mg/ml).

* Standard AFP Flacon de 0,5 ml Behringwerke référence OTOD
** M-Partigen AFP Behringwerke référence OTCV

Figure 6

Immunodiffusion radiale selon MANCINI (M Partigen)
3-4-5 Dilutions de sérum standard
6-12 et 1-2 Sérums

La conservation s'effectue à + 4°C en ayant soin de ne pas dépasser la date de péremption ; après ouverture , la plaque reste utilisable pendant deux semaines.

◆ **Technique :**

Laisser reposer la plaque ouverte environ 5 minutes à la température ambiante pour éliminer une éventuelle condensation.

Déposer dans les puits n° 1, 2 et 3 à l'aide d'une pipette EPPENDORF , 5 µl des trois dilutions du sérum étalon dans le soluté isotonique de chlorure de sodium.

Puits n°	Dilution du sérum étalon	Concentration du sérum étalon
1	1/4	55 mg/litre
2	1/2	110 mg/litre
3	1/1	220 mg/litre

On dépose 5 µl de l'échantillon à doser dans le puits suivant. Si on suspecte une concentration supérieure à 200 mg/litre , on procède préalablement à une dilution de l'échantillon (figure 6).

Maintenir les plaques fermées à la température ambiante pendant deux jours. Mesurer à 0,1 mm près , le diamètre des anneaux de précipitation en utilisant un fond noir et une loupe éclairés latéralement. Elever au carré les diamètres des anneaux de précipitation, obtenus avec les dilutions du standard, les reporter sur du papier millimétrique en fonction de la concentration (en abscisse : la concentration d'antigène en mg/litre ; en ordonnée : carrés des diamètres des anneaux en 1/100 de mm^2). En reportant les valeurs élevées au carré, on obtient normalement une droite. On lit directement sur la droite la concentration en AFP des échantillons et on multiplie par le facteur de dilution s'il y a lieu.

1-3-2- Technique d'électroimmunodiffusion sur cellogel selon Laurell : EID

◆ **Matériel :**

◇ Générateur de courant 0-500 Volts
◇ Cuve à électrophorèse CHEMETRON Tank type 2 PAC/5
◇ Bande Cellogel 5,7 x 14 cm CHEMETRON
◇ Etaleur volumétrique pour l'antisérum modèle DC/6 SEBIA
◇ Pipette EPPENDORF 5 µl

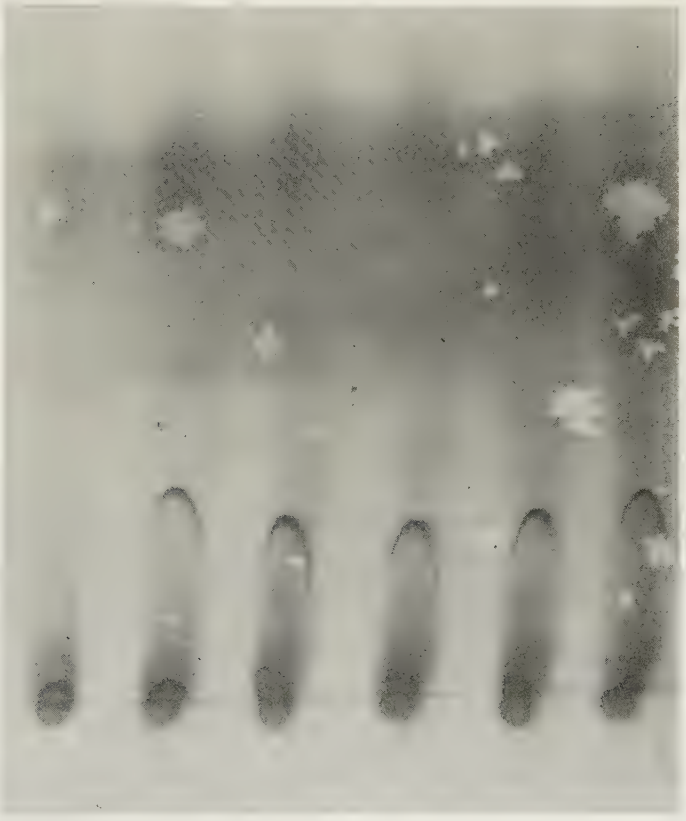
◆ **Réactifs :**

◇ **Tampon** véronal sodique 8,24 g/l
◇ NaCl 9 g/l

ELECTROIMMUNODIFFUSION SUR CELLOGEL

Photographie n° 2

de gauche à droite :
- . sérum,
- . 5 dilutions du sérum standard AFP.



Photographie n° 3

Essai de reproductibilité.
- . sérum comprenant 12 mg/litre d'AFP.

◇ **Colorant :**

Bleu de Coomassie	0,5	g
Méthanol	45	ml
Eau	45	ml
Acide acétique	10	ml

◇ **Décolorant :**

Méthanol	450	ml
Eau	450	ml
Acide acétique	100	ml

◇ **Immunsérum**
antisérum de lapin REX Behringwerke

◇ **Standard** alpha 1 Foetoprotéine (flacon de 0,5 ml)

◆ **Technique :**

◇ Immerger les bandes dans le tampon 15 minutes minimum.

◇ Les sécher légèrement entre 2 feuilles de papier filtre et les tendre sur le portoir , face absorbante à la partie supérieure.

◇ Diluer l'immunsérum au 1/8 ou 1/16 suivant le titre en anticorps dans du tampon.

◇ Diluer l'étalon (220 mg/litre) (1/32 à 1/256)

◇ Mettre l'immunsérum dans l'étaleur DC/6
Pour chaque bande étaler 150 µl d'antisérum dilué en effectuant un mouvement de va et vient jusqu'à absorption complète.

◇ Déposer sur chaque bande à **2 cm du bord cathodique**
5 µl des dilutions étalons
5 µl de sérum à analyser pur et dilué.

◇ Faire migrer 3 heures sous 120 Volts.

◇ Laver les bandes pendant 30 minutes dans du sérum physiologique sur un agitateur mécanique rotatif , en changeant une fois le bain.

◇ Colorer pendant 15 minutes

◇ Décolorer en 2 ou 3 bains

◇ Mesurer les hauteurs des pics des étalons et des échantillons. Les hauteurs sont directement proportionnelles à la concentration en AFP. (photographie n° 2).

1-4- RESULTATS :

La majorité des échantillons trouvés positifs par la DID sont dosables en immunodiffusion radiale : toutefois, cette technique ne permet pas de déterminer des taux inférieurs à 10 mg/litre. C'est pourquoi nous avons mis au point la technique d'électroimmunodiffusion sur cellogel, grâce à laquelle nous dosons les sérums négatifs par DID et positifs par l'IECC sur cellogel.

1-4-1- Vérification de la linéarité de l'IDR.

Nous avons dilué 3 sérums et 2 étalons, les droites correspondant aux dilutions de chacun des échantillons montrent la relation, entre les carrés des diamètres des précipités et les taux d'AFP. Nous voyons

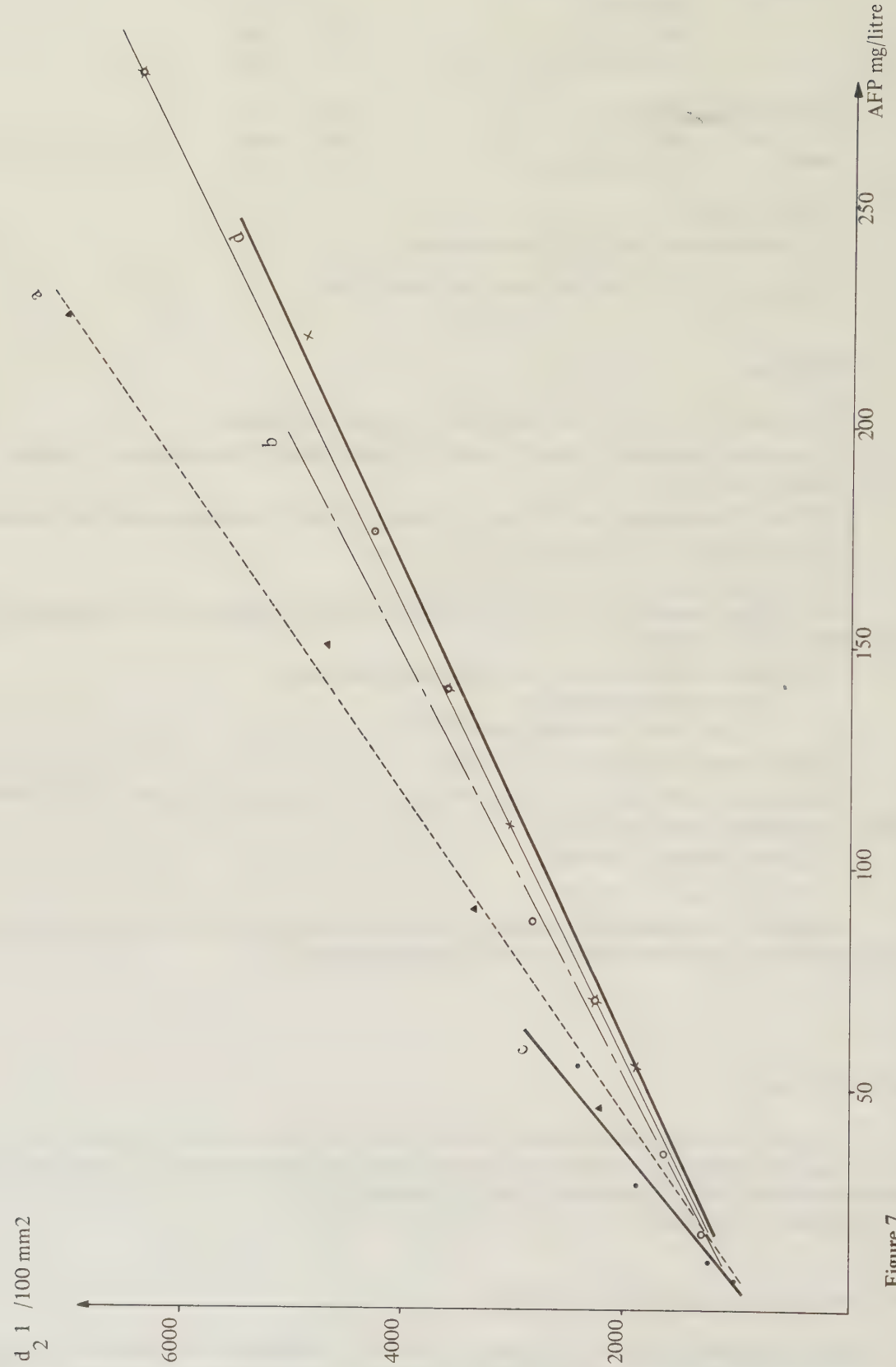


Figure 7

Immunodiffusion radiale — Etude de la linéarité.

que la réaction est linéaire entre 10 et 280 mg/litre. Les droites a, b, c correspondent à des sérums dont les concentrations en AFP sont respectivement 450, 176, 55 mg/litre ; des droites d, e à deux étalons dont les taux en AFP sont 220 et 280 mg/litre. (figure 7).

1-4-2- Etude de la reproductibilité de l'IDR :

Trois sérums ont été dosés 18 fois chacun. Sur chaque plaque de Partigen, nous avons déposé un étalonnage et 9 fois , 5 μl de sérum. L'ensemble des résultats est regroupé dans le tableau 12. La méthode est reproductible puisque dans les trois cas le coefficient de variation est inférieur à 5 %Au risque de 5 %, la valeur t (Test de Student) supérieure ou égale à 2,2 indique que les moyennes sont significativement différentes. Dans la 3ème série de dosages, nous n'avons pas regroupé les valeurs des deux plaques car t est supérieure à 2,2. Il n'y a toutefois qu'un écart de 2 % entre les valeurs moyennes.

TABLEAU 12

	1er plaque	2e plaque	Valeur des 2 plaques
Valeurs individuelles en mg/litre	95 95 100 100 95 100 100 100	105 105 100 110 95 100 100 105	
$\bar{x}$	98,89	101,66	100,27
σ	3,33	5,5	4,36
CV	3,36	4,91	4,34
t	1,38 NS		
Valeurs individuelles en mg/litre	76 76 74 78 76 78 76 76 76	75 75 75 76 78 75 75 78 75	
$\bar{x}$	76,3	75,8	76,0
σ	1,22	1,09	0,82
CV	1,31	1,7	1,1
t	1,87 NS		
Valeurs individuelles en mg/litre	185 185 190 200 185 190 185 190	185 185 185 172 185 185 180 185 185	
$\bar{x}$	187,7	183,00	
σ	3,6	4,35	
CV	1,9	2,37	
t	2,4		

IDR : Essais de reproductibilité

$\bar{x}$: valeur moyenne; σ écart-type ; CV : coefficient de variation ; t : valeur définie par le test de Student

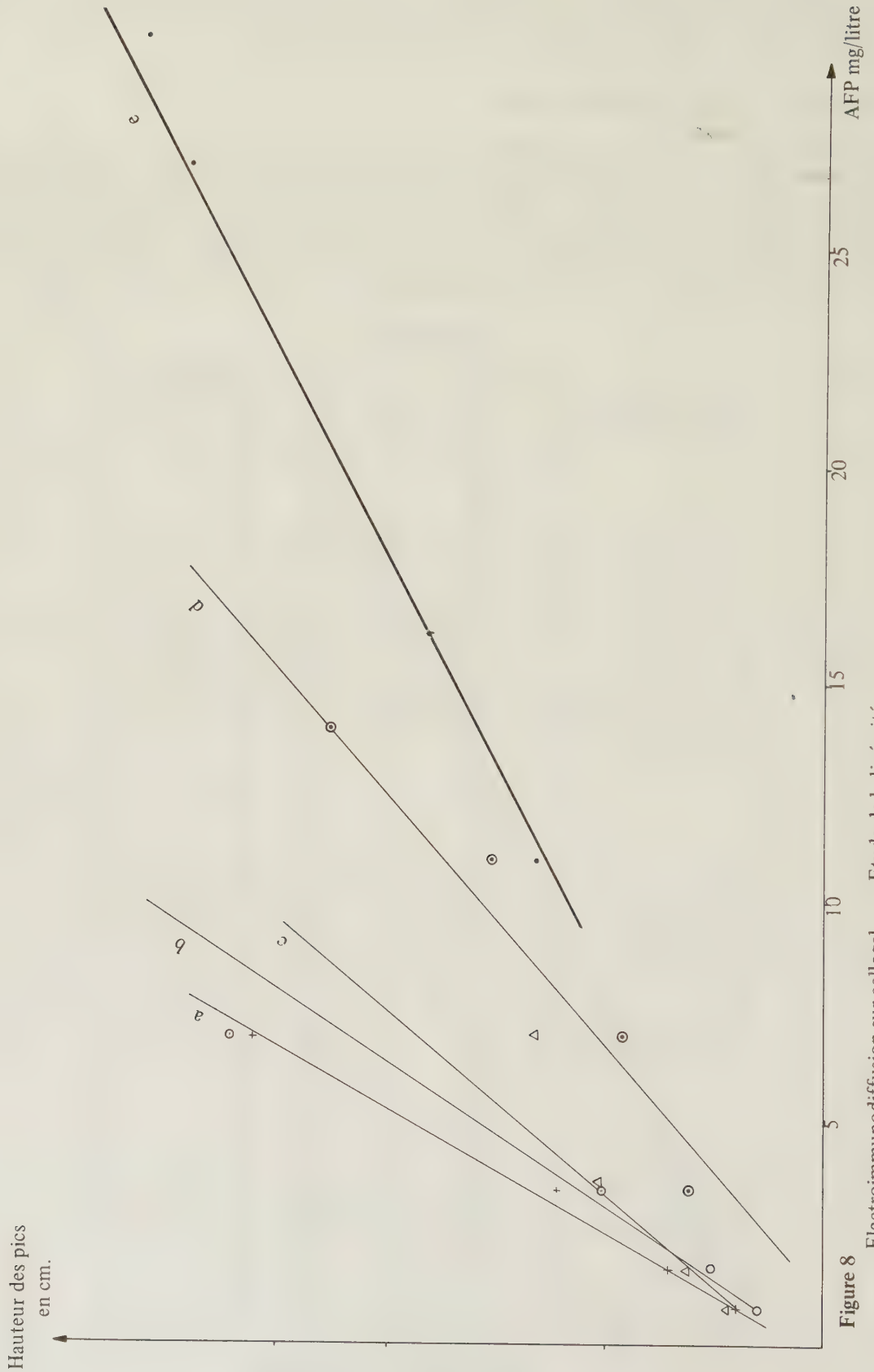


Figure 8 Electroimmunodiffusion sur cellogel. — Etude de la linéarité.

1-4-3- Conditions optima de L'EID.

En fonction du taux d'AFP des étalons et des echantillons à doser, il faut ajuster la dilution de l'antisérum. L'antisérum utilisé actuellement est dilué au 1/8. C'est la dilution optima qui permet d'obtenir des pics lisibles aisément et non tronqués. Disposant d'un étalon d'AFP à 220 mg/litre, nous encadrons sur chaque bande de cellogel, l'échantillon à doser , par 4 dilutions étalons (le plus souvent 1/32 - 1/64 - 1/128 - 1/256) comprises entre 7 et 0,80 mg/litre. La dispersion des hauteurs des pics pour une gamme donnée est liée aux conditions techniques qui d'une fois à l'autre ne peuvent être rigoureusement les mêmes (étalement de l'anticorps). Les droites d'étalonnage sont parallèles entre elles mais leur ordonnée à l'origine est différente. C'est pourquoi, pour pallier cet inconvénient, nous introduisons un étalonnage sur chaque bande de cellogel. La photographie nº 2 montre un étalonnage compris entre 13 et 3,5 mg/litre. Le pic situé à l'extrême droite est celui d'un sérum contenant 3,5 mg/litre d'AFP.

Pour une concentration sérique d'AFP égale à celle de l'étalon le plus faible (0,80 mg/litre) il est difficile de mesurer le pic d'AFP du sérum, car il est masqué par le dépôt des protéines. C'est pourquoi nous considérons le seuil de sensibilité de la technique à 1 mg/litre.

1-4-4- Vérification de la linéarité de l'EID.

Nous avons dilué deux sérums et l'étalon, et vérifié la linéarité de la réaction. La linéarité existe dans une zone étroite de concentration car nous sommes obligés de rester dans une zone d'équivalence Ag-Ac. Les pics obtenus sont facilement mesurables car de hauteur assez grande. SIZARET (196) a pratiqué des dosages par EID en gel d'agarose ; pour une concentration d'AFP de 3,6 mg/litre la hauteur du pic Ag-Ac est de 0,3 cm ; pour une concentration identique, le cellogel donne un pic de 1 cm. Les résultats de HIRCH MARIE (96) sont du même ordre de grandeur que ceux de SIZARET. D'autres auteurs ont déterminé la linéarité de cette technique sur agarose : DENIS (61) montre aussi qu'il est nécessaire d'introduire un étalonnage sur chaque plaque ; LEHMANN (122) estime que la technique est linéaire entre 17 et 250 mg/litre.

Les droites reproduites sur la figure 8, représente deux étalonnages (a-b-c-d) et un sérum dilué (c) dont le taux en AFP est de 30 mg/litre.

1-4-5- Etude de la reproductibilité de l'EID.

Nous avons choisi deux sérums de taux faible 12 mg/litre et 3,5 mg/litre et déposé 6 fois, 5 µl de sérum sur 2 bandes de cellogel. L'anticorps utilisé est dilué au 1/8. L'ensemble des résultats est regroupé dans le tableau 13 et la photographie nº 3 représente l'essai de reproductibilité du sérum comprenant 12 mg/litre.

TABLEAU 13

	1e bande de cellogel	2e bande de cellogel	Valeurs des 2 bandes
Valeurs individuelles en mg/litre	13 11 11 12 13	12,5 12 11,5 12 16 16	
$\bar{x}$	12,0	13,3	12,7
σ	1	2,09	1,75
CV	8,3	15,7	13,78
t	1,53 NS		
Valeurs individuelles en mg/litre	5,5 3,5 3,5 2,5 3,5 4,5	4,5 3,5 3 3 4 5	
$\bar{x}$	3,83	3,84	3,833
σ	1,03	0,81	0,89
CV	26,9	24	23,24
t	0,02 NS		

EID : Essais de reproductibilité

Le coefficient de variation des résultats de la première bande de cellogel est inférieur à 10 % : il est acceptable. Les autres sont nettement supérieurs, le degré d'incertitude atteint 20 pour 100. Il est dû aux faibles concentrations et aux conditions techniques.

L'IDR est une technique nettement plus reproductible que l'EID sur cellogel.

Nous avons aussi testé de nombreux autres sérums en les dosant plusieurs fois pur ou dilué pour vérifier la reproductibilité de la méthode (tableau 14).

TABLEAU 14

Dilution	Hauteur des pics en cm	Taux en mg/litre	$\bar{x}$ mg/litre
pur	0,8	5,6	
pur	0,68	3,6	4,8
1/4	0,26	5,1	
pur	1,25	4,0	
pur	1,19	3,6	4
1/4	0,37	4,5	
pur	1,21	3,7	
pur	1,3	4,2	3,8
pur	0,5	3,4	
pur	0,5	5,2	
pur	0,5	3,4	4,7
1/4	0,24	5,4	
pur	1,95	6,5	
pur	1,60	6,2	7,9
1/4	0,74	10,2	
1/4	0,95	9	
1/4	0,34	8,4	
1/4	0,59	11,8	9,5
1/8	0,23	8,4	
pur	0,3	2,5	
pur	0,2	2	2,3
pur	0,6	2,5	
pur	0,20	0,95	
1/2	0,15	1,06	1,00

EID : Essais de reproductibilité

1-4-6- Comparaison entre la technique d'IDR et d'EID.

La technique d'EID a été appliquée à des sérums déjà dosés en IDR de taux supérieurs à 10 mg/l. Pour que la technique soit valable, nous avons dû ajuster la dilution de l'antisérum.

L'étalon à 220 mg/litre d'AFP ne peut être dosé par cette technique même avec un anticorps dilué au 1/2. C'est pourquoi nous avons choisi des sérums dont le taux était inférieur à 150 mg/litre (Tableau 15)

TABLEAU 15

Dilution	Taux en mg/litre	
	EID	IDR
pur 1/2 1/2	105 144 104	137
pur 1/2	15 17	22
1/4 1/4 1/8	8,4 11,8 8,4	12
pur 1/2	40 42	46
pur 1/2	70 80	85

Etude comparative des résultats obtenus par IDR et EID

L'électroimmunodiffusion sur cellogel est de réalisation délicate, il semble que sa sensibilité comme nous l'avons vu soit nettement supérieure à celle de l'EID en gel d'Agarose (hauteurs des pics supérieures). Cette technique est utilisable pour mesurer les taux faibles d'AFP compris entre 1 mg/l et 20 mg/l. Toutefois la reproductibilité est nettement moins bonne que celle de l'IDR, chaque valeur est donnée avec un coefficient d'incertitude d'environ 20 %.

II – INTERET CLINIQUE

2-1- RESULTATS :

Notre étude a porté sur 483 patients atteints de maladie de l'appareil digestif, pour lesquels 590 recherches ont été effectuées. Nous avons aussi testé 37 sérums provenant de malades sans aucune atteinte hépatique ou digestive, que nous avons considérés comme un groupe témoin.

Nous avons trouvé 92 cas positifs répartis en 7 groupes, 92 cas pour lesquels 115 recherches se sont avérées positives

2-1-1- Cancers primitifs du foie : 34 (cas 1 à 34),

2-1-2- Hépatocholangiome : 1 (cas 35),

2-1-3- Cancers secondaires du foie : 19 (cas 36-54),

2-1-4- Cancers primaires sans métastase hépatique : 7 (cas 55-61),

2-1-5- Hépatites : 11 (cas 62-72),

2-1-6- Cirrhoses : 15 (cas 73-87),

2-1-7- Autres hépatopathies : 5 (cas 88-92).

Nous étudions uniquement les cas positifs trouvés dans chacun de ces groupes.

2-1-1- Cancers primitifs du foie :

2-1-1-1- Répartition des malades :

Les malades ont été répartis en trois groupes :

- Le groupe 1 correspond aux hépatomes greffés sur cirrhoses et confirmés par des arguments histologiques ;
- Le groupe II aux hépatomes sur foie antérieurement sain ;
- Le groupe III aux hépatomes probables en raison d'arguments cliniques, scintigraphiques, laparoscopiques ou artériographiques mais non confirmés par l'histologie.

Les tableaux 16 , 17 et 18 exposent tous les cas étudiés compris dans cette classification avec les recherches et dosages sériques effectués.

TABLEAU 16 : MALADES GROUPE I

CAS	SEXE	AGE	RECHERCHE POSITIVE par			DOSAGE par		METHODES DIAGNOSTIQUES
			DID	IECC		IDR	EID	
				Agarose	Cellogel	mg/litre	mg/litre	
1	M	58	+	+	+	470		VA
2	F	55	+	+	+	125		PB
3	M	63	+	+	+	238		PB
4	M	73	+	+	+	134		VA
5	M	64	+	+	+	50		PB
6	M	57	+	+	+	580		VA
7	M	69	+			non dosé		VA
8	M	57	+	+	+	1150		PB
9	M	82	+	+	+	35		VA
10	M	73	—	+	+		1	VA
11	M	54	—	—	+		< 1	PB
12	M	67	+	+	+	12-26-44		PB
13	M	71	+ ou —	+	+		4,8-4,3-3,8 4,7-7,9	VA
14	M	62	+	+	+	non dosé		VA
15	M	40	+	+	+	<200*-990 1060		VA
16	M	74	+	+	+	40		VA

HEPATOMES GREFFES SUR CIRRHOSES

PB : ponction biopsique , VA : vérification anatomique.
200* : ce résultat a été déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

TABLEAU 17 : MALADES GROUPE II

CAS	SEXE	AGE	RECHERCHE POSITIVE par			DOSAGE par		METHODES DIAGNOSTIQUES
			DID	IECC		IDR	EID	
				Agarose	Cellogel	mg/litre	mg/litre	
17	M	59	+	+	+	74		PB
18	M	71	—	+	+		3,4	VA
19	M	67	+	+	+	≃ 450		PB
20	M	70	—	+	+		4	PB
21	M	71	+	+	+	? -46-37		PB
22	M	84	+	+	+	2800-3100		PB

HEPATOMES SUR FOIE SAIN

TABLEAU 18 : MALADES GROUPE III

CAS	SEXE	AGE	RECHERCHE POSITIVE par			DOSAGE par		METHODES DIAGNOSTIQUES
			DID	IECC		IDR	EID	
				Agarose	Cellogel	mg/litre	mg/litre	
23	M	55				290		L + Sc
24	M	56					6,5	Sc
25	M	54	–				2,4	L + Sc
26	M	74	–				2,6	L + Sc
27	M	60	–				2,6	L
28	M	57		+		448		Sc
29	M	71	–	–			1	L
30	M	69	–	–			1	
31	M	?				170		Cl
32	F	61	–				2,3	Sc
33	F	61		+		37-22		Sc
34	M	?	+	+		28-37-38		Cl

HEPATOMES PROBABLES

en raison d'arguments cliniques (Cl) scintigraphiques (Sc) laparoscopiques (L), ou artériographiques (Ar).

2-1-1-2- Evolution du taux d'AFP :

Pour 8 malades, nous avons pu effectuer deux dosages ou plus. L'évolution du taux d'AFP sérique fut différente suivant les cas.

TYPE D'EVOLUTION	NOMBRE DE CAS
Taux décroissant	2
Taux variable	1
Taux croissant	5

Le tableau 19 réunit les résultats des taux d'AFP chez 8 malades ayant eu au minimum deux prélèvements. Les valeurs sont données en mg/litre ; on a indiqué entre parenthèses, le nombre de jours écoulés depuis le premier prélèvement.

TABLEAU 19

CAS 12	12	(1)	26	(13)	44	(15)			
CAS 13	4,8	(1)	4	(7)	3,8	(8)	4,7	(15)	7,9 (20)
CAS 14	AFP(-)	(1)	AFP (+)	(300)					
CAS 15	<200	(1)	990	(120)	1060	(126)			
CAS 21	non dosé	(1)	46	(12)	37	(53)			
CAS 22	2800	(1)	3100	(14)					
CAS 33	37	(1)	22	(10)					
CAS 34	28	(1)	37	(7)	38	(12)			

Evolution des taux dans 8 cas d'Hépatomes

Pour le cas 15, la découverte d'AFP positive par les techniques d'immunoprécipitation et par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide nous a incités à rechercher sa présence sur les tracés des électrophorèses précédentes. Aucun pic n'apparaissait sur un tracé effectué 4 mois auparavant. Le seuil de sensibilité de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, appliquée au cas particulier de l'AFP étant de 200 mg/litre, nous en avons déduit qu'à cette période, l'AFP n'était pas encore apparue ou était à un taux inférieur à 200 mg/litre. En 4 mois, ce taux s'est élevé à 1 000 mg/litre.

– Chez trois malades, l'AFP a été dosée dans le liquide d'ascite.

CAS	SANG	ASCITE
15	1 060 mg/l	410 mg/l
16	40 mg/l	3,6 mg/l
21	46-37 mg/l	10 mg/l

On peut voir que les taux dans le liquide d'ascite sont toujours inférieurs à ceux du sérum. L'AFP apparait plus ou moins tôt dans le sérum, et le liquide d'ascite au cours de l'évolution de l'hépatome mais il est important de noter que l'AFP ne disparait jamais excepté dans le cas d'une hépatectomie. Nous n'avons pas pu observer de disparition d'AFP sérique, le décès des malades étant survenu dans le majorité des cas très rapidement après la découverte de l'AFP.

– Dans trois cas, l'AFP a été recherchée dans des fragments de foie tumoral (Tableau 20), un foie de cirrhose banale a été utilisé comme témoin négatif. Les recherches ont été faites par DID et IECC sur Cellogel : 0,25 g de tissu sont broyés mécaniquement dans un ml de tampon véronal. Le mélange est centrifugé à grande vitesse pendant quinze minutes. Le surnageant est utilisé pour la recherche et le dosage. Nous prélevons systématiquement 3 fragments de tissu en différents points de la tumeur.

TABLEAU 20

CAS	SANG	ASCITE	BROYATS DE TUMEUR.
CAS 13	4,8-3,8-4,7 mg/l		AFP(+)
CAS 15	990-1 060 mg/l	410 mg/l	5,3 mg/100 g de tissu
CAS 16	40 mg/l	3,6 mg/l	AFP (+)

Recherche d'AFP : broyats de tumeur

Pour le cas 15 dont le taux d'AFP a pu être dosé par la technique d'immunodiffusion radiale, nous avons aussi effectué une recherche sur gel de polyacrylamide en déposant une quantité de broyat six fois supérieure à celle utilisée habituellement ; un faible pic suivant l'albumine est apparu.

– Avec ce même fragment de foie (cas 15), nous avons fait effectuer une séparation électrophorétique sur acétate de cellulose des isoenzymes de la lacticodéshydrogénase. Dans la même cuve , ont migré un échantillon de foie normal d'enfant et un échantillon de foie foetal (22ème semaine).

La similitude frappante des tracés électrophorétiques du foie foetal et de l'hépatome, confirme l'hypothèse du retour à un état embryonnaire des cellules hépatiques lors d'une cancérisation.

Nous exposons dans le tableau 21 les pourcentages des isoenzymes de la lacticodéshydrogénase dans 3 prélèvements.

TABLEAU 21

FRACTIONS	CAS 15 FRAGMENT D'HEPATOME	FOIE FOETAL	FOIE NORMAL ENFANT
I	5 %	5 %	1 %
II	8 %	10 %	5 %
III	20 %	17 %	8 %
IV	22 %	19 %	13 %
V	45 %	49 %	73 %

Isoenzymes de la lacticodéshydrogénase

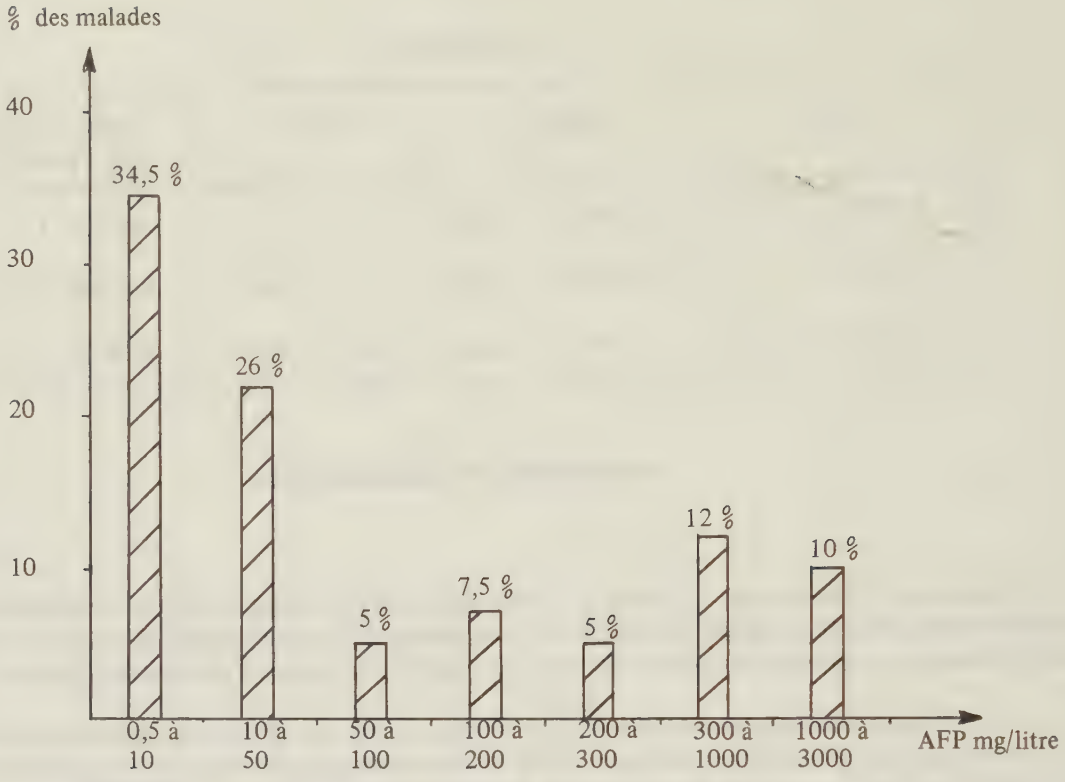


Figure 9

Répartitions des concentrations d'AFP dans 32 hépatomes.

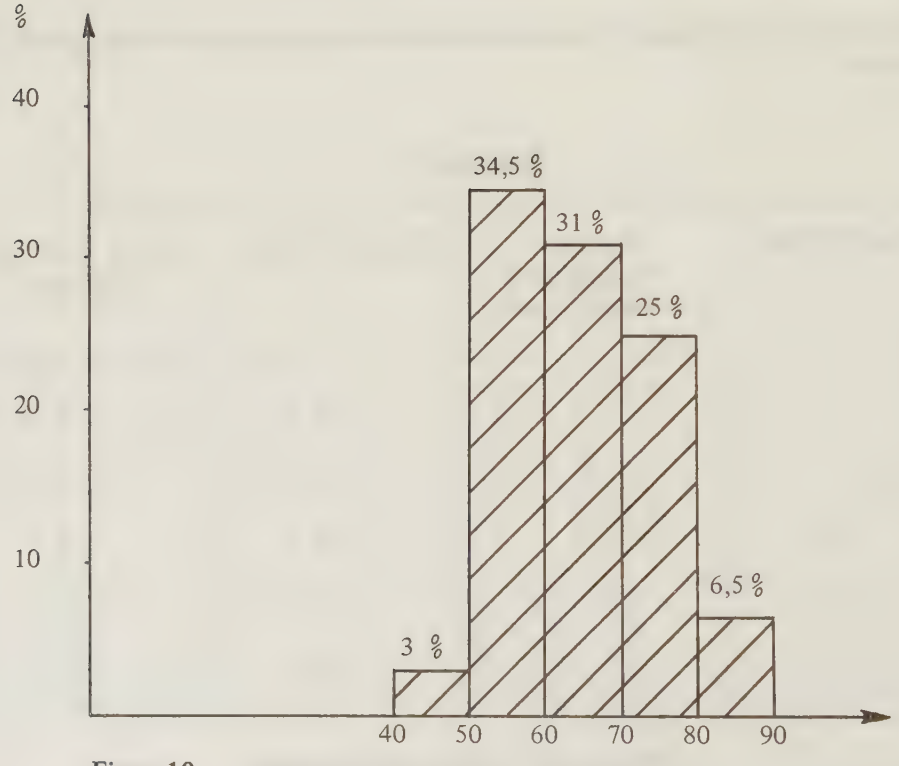


Figure 10

Histogramme de la répartition de l'âge des malades porteurs d'un Hépatome (AFP +)

2-1-1-3- Répartition des concentrations sériques :

Les concentrations d'AFP dans les divers sérums positifs sont extrêmement variables, comprises entre 1 et 3 100 mg/litre. La figure 9 représente cette répartition. Chez 60 % des malades, les taux étaient faibles 1 à 50 mg/litre. Les résultats confirment ceux de HIRSCH-MARIE et HUGUET (96) qui trouvent :

35,6 % des taux entre 0 et 10 mg/litre,
24,4 % des taux entre 10 et 50 mg/litre.

2-1-1-4- Fréquence des cas AFP positif en fonction du sexe, en fonction de l'âge :

Parmi les 33 malades atteints de cancers primitifs du foie, 30 étaient du sexe masculin, c'est-à-dire 90 %. Notre pourcentage confirme les publications déjà faites à ce sujet prouvant que les hommes sont plus souvent porteurs de CPF que les femmes. L'histogramme (figure 10) de la répartition de l'âge des malades atteints de CPF avec AFP positive montre qu'il y a un maximum de positivité entre 50 et 70 ans.

2-1-2- Hépatocholangiome :

Cas n° 35, c'est un malade de 43 ans pour lequel une seule recherche d'AFP sérique fut pratiquée. Elle fut positive et son taux déterminé par immunodiffusion radiale était de 410 mg/litre. Une ponction biopsie post mortem a permis d'affirmer que ce malade présentait un hépatocholangiome sur cirrhose éthylique.

2-1-3- Cancers secondaires du foie :

L'AFP a pu être mise en évidence dans 19 cancers secondaires du foie. La vérification anatomique n'a pas toujours été pratiquée.

TABLEAU 22

CAS	SEXE	AGE	CANCER PRIMITIF	RECHERCHE POSITIVE par DID	IECC Agarose	IECC Cellogel	DOSAGE EID mg/l	METHODES DIAGNOSTIQUES
36	F	53	Estomac	–	+	+	3	VA
37	F	82	Estomac	–	–	+	< 1	L
38	F	60	Indéterminé	–	–	+	< 1	VA
39	M	74	idem	–	+	+	< 1	L + Sc
40	M	57	idem	–	–	+	< 1	VA
41	M	70	idem	–	–	+	< 1	L
42	F	60	idem	–	–	+	< 1	L + Sc
43	F	31	idem	–	–	+	< 1	L + Art
44	F	68	idem	+	+	+	104 *	VA
45	F	70	idem	+	+	+	non dosé	PB
46	F	71	Colon	–	+	+	1,3	L
47	F	61	Colon	–	–	+	< 1	L + PB rectale
48	M	58	Sigmoïde	–	–	+	< 1	Sc
49	F	61	Sigmoïde	–	+	+	< 1	VA
50	F	43	Sein	–	–	+	< 1	VA
51	F	50	Sein	–	–	+	< 1	L
52	F	50	Médullaire	–	–	+	< 1	L + Cl
53	M	67	Bronches	–	+	+	3,4	L
54	M	85	Rein	–	+	+	1	VA

Cancers secondaires du foie

De notre étude, il ressort qu'il y a 70 % de femmes parmi les malades porteurs de cancers secondaires du foie (AFP +) et que la moyenne des taux d'AFP est nettement inférieure à celle des cancers primitifs du foie. En effet, on remarque sur le tableau 22 que la recherche a été exceptionnellement positive par la technique de DID (cas 44-45).

2-1-4- Cancers primitifs sans métastase hépatique :

6 malades porteurs d'un cancer primitif ont présenté dans leur sérum des traces d'AFP. L'atteinte hépatique a été exclue par des examens anatomopathologiques dans 6 cas sur 7. Un enfant atteint d'une dysplasie multikystique du rein gauche (cas 59) atteint un taux sérique de 3,7 mg/litre. (Tableau 23).

VA vérification anatomique ; PB : ponction biopsique ; SC : scintigraphie . Art . artériographie ; L . laparoscopie , Cl arguments cliniques ; 104 mg/l * : le dosage a été effectué par IDR.

TABLEAU 23

CAS	SEXE	AGE	CANCER PRIMITIF	RECHERCHE POSITIVE par			DOSAGE EID mg/l	METHODES DIAGNOSTIQUES
				DID	IECC			
					Agarose	Cellogel		
55	M	63	PANCREAS	–	–	+	< 1	L
56	M	46	PANCREAS	–	–	+	< 1	VA
57	F	70	ESTOMAC	–	–	+	< 1	BC
58	F	70	SIGMOIDE	–	–	+	< 1	BC
59	M	enfant	REIN	–	+	+	3,7	BC
60	F	62	OVAIRE	–	–	+	< 1	BC
61	F	70	OVAIRE	–	–	+	< 1	VA

Cancers primitifs sans métastase hépatique

2-1-5- Hépatites virales :

Nous avons détecté la présence d'AFP dans quelques hépatites pour lesquelles un seul prélèvement a eté effectué. Pour d'autres, nous avons pu suivre l'évolution de l'AFP et la comparer a celle de la bilirubine, des phosphates alcalines, des transaminases , de l'Antigène Australia.

TABLEAU 24

CAS	SEXE	AGE	NOMBRE DE RECHERCHES AFP (+)	RECHERCHE POSITIVE par			DOSAGE PAR		Preuves Histologiques
				DID	IECC		IDR mg/l	EID mg/l	
					Agarose	Cellogel			
62	F	23	1/1	–	–	+		< 1	
63	M	28	1/1	–	–	+		< 1	
64	M	64	1/1	–	–	+		< 1	PB
65	F	26	1/3	+	+	+	60		PB
66	F	38	1/5	+	+	+		5,8	PB (2)
67	F	25	1/9	–	–	+		< 1	
68	F	21	6/8	–	–	+		< 1	
69	F	18	7/12	–	+	+		≥ 1	PB
70	F	36	1/4	–	–	+		< 1	PB
71	F	75	1/9	–	–	+		< 1	PB
72	F	16	5/7	–	+	+	25	≥ 1	

Hépatites virales

On pourrait classer ces hépatites en 4 groupes :

- Groupe I : cas 62-63-64-67-70-71

présence d'AFP une seule fois à l'état de traces.

VA : vérification anatomique ; L : laparoscopie , BC : biopsie chirurgicale

TABLEAU 25

CAS	DATE	Recherche d'AFP	BILIRUBINE mg/litre			PHOSPHATASES ALCALINES	TRANSAMINASES		ANTIGENE Australia
			totale	conjuguée	libre	UB	GOT	GPT	
62	1 jour	–	33	27	6		640	3480	–
	4	–	64	52	12		175	600	–
	8	+	36	28	8		95	250	–
	12	–	17	11	6		49	80	–
	15	–	15	11	4		36	67	–
65	1	+	5,5	0	5,5	1,6	18	9	–
	30	–	6,5	0	6,5	1,2	23	17	–
			5,5	0	5,5	1,5	28	21	–
66	1	–	3	0	3	9	136	160	–
	5		4	0	4	5,5	46	78	–
	14	+ +	3	0	3	4			
	21	–	4	0	4	3,5	16	12	–
	28	–	2	0	2	< 2	16	10	–
	35	–	3	0	3	< 2	22	10	–
67	1	–	49	41	8	3	300	320	+
	9	–	20	14	6	3,5	108	176	+
	13	–	20	18	2	4,5	216	292	+
	17	–	16	12	4	3	87	150	+
	20	+	14	12	2	2	200	80	–
	24	–	11	0	11	< 2	38	46	–
	27	–	8	0	8	2	39	32	–
	30	–	9	0	9	1	53	27	–
	36	–	4	0	4		21	17	–
68	1	–	54	22	32		45	20	–
	14	+	59	47	12	5,5	53	39	–
	17	+	55	23	32	5,5	201	155	+
	21		54	48	6	6,5	275	185	+
	24	+	47	17	30	6,5	264	232	
	28	–	37	21	16		250	270	–
	31	–	28	12	16		136	128	–
	35		25	19	6		214	282	–
	38		16	10	6		230	220	–
	41	+	14	8	6		130	160	–
	45	+	12	2	10		95	119	–

TABLEAU 25

CAS	DATE	Recherche d'AFP	BILIRUBINE mg/litre			PHOSPHATASES ALCALINES	TRANSAMINASES		ANTIGENE Australia
			totale	conjuguée	libre	UB	GOT	GPT	
69	1	–	245	177	68	4,5	875	840	+
	3	–	270	250	20	4,5	1730	1400	+
	8	–							
	11	+	248	235	14	3,5	495	450	+
	14	+	172	140	32	< 2	230	170	+
	15	+							
	20	+	102	84	18		220	210	–
	25	+	81	67	14	2	145	185	+
	28	+	61	55	6	< 2	113	115	
	32	+	49	43	6	< 2	45	62	+
	35	–	39	35	4	< 2	19	31	+
	39	–	31	27	4	< 2	17	28	
70	1		7	0	7	3	220	210	–
	5		2	0	2	2	80	148	–
	6	–							
	11		3	0	3	2	20	40	–
	12	+							–
	36	–							–
	50	–					< 10	< 10	–
72	1							1262	–
	12	+	100	88	12	7	146	240	–
	19		49	37	12	< 2	150	275	–
	26	+	28	20	8		59	120	–
	29	+					36	52	–
	33	+	19	15	4	3	39	54	–
	34	–							

Les taux de bilirubine sont donnés en mg/litre.
– phosphatases alcalines en unités Bodansky/ml.
– transaminases en unités Reitman-Frankel/ml.

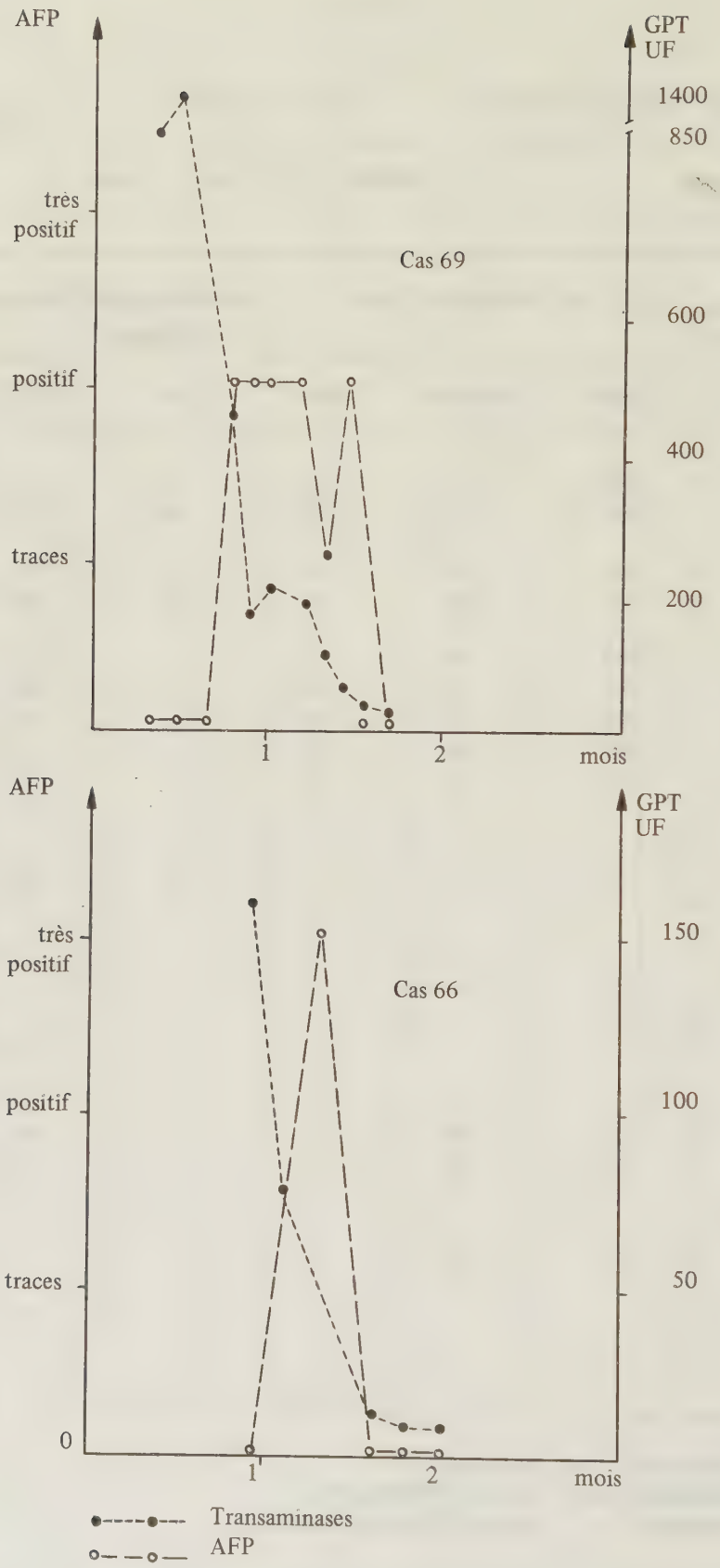


Figure 11

Evolution comparée pendant deux mois des transaminases exprimées en unités REITMAN-FRANKEL/ml et de l'AFP sérique

• Groupe II : cas 68
Présence d'AFP : plusieurs fois (6) à l'état de traces.

• Groupe III : cas 65-66
Présence d'AFP : une seule fois à des taux élevés.

• Groupe IV : cas 69-72
Présence d'AFP : plusieurs fois à des taux élevés.

On remarque que ces quelques cas positifs le furent toujours de façon transitoire. Il s'ensuit que le diagnostic différentiel avec l'hépatome ne pose aucun problème, d'autant plus qu'une détermination quantitative fait apparaitre le plus souvent des taux faibles dans le cas des hépatites.

Nous avons comparé l'évolution des taux de la bilirubine, des phosphatases alcalines , des transaminases et de l'AFP. Le tableau 25 regroupe tous les résultats de 8 hépatites étudiées. Le premier jour des examens correspond le plus souvent à l'entrée du malade dans le service d'hospitalisation.

L'AFP apparait aussi bien dans les hépatites ictériques qu'anictériques, avec ou sans antigène Australia (93). Alors que sa présence ne semble pas avoir de rapport avec le taux des phosphatases alcalines, il est manifeste que l'AFP apparait lors de la normalisation des enzymes de cytolyse, c'est-à-dire au moment d'une intense régénération du parenchyme hépatique. A titre d'exemple , (figure 11) nous avons comparé cette évolution chez deux malades (cas 66 et 69).

Trois hépatites ont atteint des taux maxima relativement élevés (60, 25 et 5,8 mg/litre) et la disparition a eté rapide (5 jours pour le cas 66). Le tableau ci-dessous réunit les résultats des taux d'AFP dosables chez deux malades suivis régulièrement. Les valeurs sont données en mg/litre ; on a indiqué entre parenthèses le nombre de jours écoulés depuis le premier prélèvement.

cas 69	1 (11)	1,5 (14)	1,8 (15)	1 (20)	<1 (25)	1 (28)	< 1 (32)
cas 72	25 (1)	1 (12)	1 (14)	<1 (16)	0 (20)		

Les taux trouvés dans ces cas d'hépatites furent élevés : si on les compare aux résultats de DENIS (61) (inférieurs à 0,5 mg/litre dans tous les cas) ou à ceux d'ABELEV (7) compris entre 0,05 et 0,5 mg/litre (excepté un cas dont le taux fut beaucoup plus fort).

2-1-6- Cirrhoses :

Des recherches d'AFP ont été pratiquées sur un grand nombre de malades atteints de cirrhose. Sur les 15 sérums donnant une réponse positive, un seul pouvait être dosé : 6,7 mg/l il s'agissait d'un homme de 81 ans porteur d'une cirrhose éthylique décompensée avec œdème et ascite dont l'évolution fut foudroyante.

TABLEAU 26

CAS	SEXE	AGE	RECHERCHE POSITIVE par DID	IECC Agarose	IECC Cellogel	DOSAGE par EID mg/litre
73	M	81	+	+	+	6,7
74	M	66	–	–	+	< 1
75	M	56	–	–	+	< 1
76	M	80	–	–	+	< 1
77	M	66	–	–	+	< 1
78	F	37	–	–	+	< 1
79	F	70	–	–	+	< 1
80	M	41	–	–	+	< 1
81	F	43	–	–	+	< 1
82	M	65	–	–	+	< 1
83	M	44	–	–	+	< 1
84	M	43	–	–	+	< 1
85	M	74	–	–	+	< 1
86	M	43	–	–	+	< 1
87	M	65	–	–	+	< 1

Cirrhoses

Nous remarquons que c'est uniquement grâce à la technique d'IECC sur cellogel que nous avons pu mettre en évidence l'AFP dans un certain nombre de cirrhoses.

2-1-7- Autres cas :

Nous avons mis en évidence la présence d'AFP à l'état de traces non dosables dans 5 hépatopathies non cancéreuses :

- 2 affections des voies biliaires,

cas 88 , homme de 69 ans porteur d'une lithiase vésiculaire et d'un ulcère duodénal.
cas 89, homme de 68 ans porteur d'une lithiase vésiculaire.

- 2 hépatomégalies,

cas 90, Cas 91.

- une cholostase gravidique.

cas 92, femme de 34 ans présentant une cholostase gravidique avec hépatomégalie douloureuse. Une laparoscopie et une ponction biopsie ont été faites.

TABLEAU 27

DIAGNOSTIC	D I D		I E C C agarose		I E C C Cellogel	
	AFP (+) nombre de cas	% AFP (+)	AFP (+) nombre de cas	% AFP (+)	AFP (+) nombre de cas	% AFP (+)
HEPATOMES						
Groupe I	13		15		16	
Groupe II	4		6		6	
Groupe III	6		10		12	
Total :	23/42	54	31/42	73	34/42	80
HEPATOCHOLANGIOMES	1/2		1/2		1/2	
CANCERS SECONDAIRES DU FOIE	2/71	2,8	8/71	11	19/71	26
CANCERS PRIMAIRES SANS METASTASE HEPATIQUE	0/60	0	1/60	1,6	7/60	11,5
HEPATITES	2/56	3,5	4/56	7	11/56	19
CIRRHOSES	1/156	0,6	1/156	0,6	15/156	9,5
AUTRES HEPATOPATHIES NON CANCEREUSES	0/63	0	0/63	0	5/63	8
HEMOCHROMATOSES	0/4	0	0/4	0	0/4	0
ANEMIES	0/10	0	0/10	0	0/10	0
PANCREATITES	0/3	0	0/3	0	0/3	0
AFFECTIONS DE L'ESTOMAC	0/12	0	0/12	0	0/12	0
ULCERES DUODENAUX	0/4	0	0/4	0	0/4	0
TEMOINS	0/37	0	0/37	0	0/37	0

Fréquence de l'AFP en fonction de la technique de recherche employée

III – DISCUSSION

Notre etude a porté sur 520 malades pour lesquels 627 recherches ont eté faites. Suivant les techniques employées nous avons obtenu un pourcentage variable de résultats positifs.

- La DID a eté positive 42 fois sur 627 soit 7 %
- L'IECC sur agarose 66 fois sur 627 soit 11 %
- L'IECC sur cellogel 115 fois sur 627 soit 18 %

Nous avons réuni dans le tableau 27 la fréquence des cas cliniques observés en fonction de la technique utilisée (67). La DID permet de déceler un fort pourcentage d'hépatomes dont les taux en AFP sont le plus souvent supérieurs à 10 mg/litre. L'IECC sur agarose augmente ce pourcentage. L'IECC sur cellogel l'augmente aussi , mais surtout révèle la présence d'AFP dans de nombreuses hépatopathies et dans quelques cancers primitifs à localisation extra-hépatique.

La lecture de nos résultats montre la plus grande sensibilité de l'IECC sur cellogel. Elle a permis la diagnostic de 80 % des cas des cancers primitifs du foie ; cependant 20 % des hépatomes concernés par notre étude n'ont pas été accompagnés d'une production d'AFP. Il semble se confirmer que certaines formes d'hépatome puissent ainsi évoluer sans cette manifestation significative. La recherche d'AFP permet une bonne orientation diagnostique, particulièrement chez les cirrhotiques lorsque l'évolution péjorative n'est pas expliquée par ailleurs. De toutes façons, ce test ne permet qu'exceptionnellement un diagnostic suffisamment précoce pour permettre une tentative d'exérèse de la tumeur.

Nous avons pu effectuer des recherches régulières d'AFP lors de plusieurs hépatites. Dans le cas où les dosages ont été répétés, nous avons noté une augmentation régulière puis une chute plus rapide. Nos travaux ont montré que l'AFP apparait lors de la normalisation des enzymes de cytolyse, c'est-à-dire au moment d'une intense régénération hépatique. Le gain de sensibilité de l'IECC sur cellogel s'accompagne d'une perte de spécificité puisque nous avons mis en évidence l'AFP dans 19 cancers secondaires du foie et 7 cancers primitifs sans métastase hépatique. Un faible pourcentage (9,5 %) de cirrhoses présente des traces d'AFP : il pourrait être intéressant de suivre l'évolution de ces cirrhoses vers un éventuel processus de cancérisation. Il faut noter encore la présence à l'état des traces de l'AFP dans 5 hépatopathies non cancéreuses : deux affections des voies biliaires , deux hépatomégalies et une cholostase gravidique.

La méthode est sélective comme le montrent les résultats négatifs trouvés pour les anémies, les pancréatites et un groupe témoin. Le groupe témoin comprenait un certain nombre de malades hospitalisés pour des troubles bronchopulmonaires , 2 maladies de Basedow, des rhumatisants, des cardiaques, des états infectieux, et des malades atteints de troubles divers (céphalies, vertiges, etc ...). Contrairement à certains résultats publiés (40-78) nous n'avons pas retrouvé l'AFP dans le sérum des 4 hémochromatosiques étudiés.

La mise au point de cette technique de recherche présente un grand intérêt dans le recherche courante d'AFP. Elle a l'avantage d'être de réalisation facile et rapide. En comparant nos résultats avec ceux obtenus par ABELEV (7) par l'immunoautoradiographie, nous nous apercevons que l'IECC sur cellogel est pratiquement aussi sensible que cette dernière technique. En effet ABELEV détecte l'AFP dans 83 % des CPF, 14 % des cancers secondaires du foie et 13 % des hépatites virales. Bien que nous n'ayons jamais observé de fausses réactions positives dans nos travaux de recherche, il faut être prévenu que de telles réactions peuvent exister ; l'origine serait à rechercher dans l'existence d'une eventuelle beta-foetoprotéine (21-54-197-198) ou d'anticorps dirigés contre l'antisérum utilisé ou même d'anticorps antitétaniques (94). De même le test au latex est un test

rapide, mais il est indispensable de faire en même temps une recherche par immunoprécipitation pour éliminer les fausses réactions positives et même d'introduire une réaction avec un latex de contrôle (20).

On peut conclure qu'en routine, la recherche doit être faite par la technique d'OUTCHERLONY couplée avec l'immunoélectrophorèse à contre courant sur cellogel, ou par l'IECC seule appliquée à un échantillon pur et dilué ; on détectera ainsi environ 80 % des carcinomes.

Nous avons employé deux techniques de dosage ; quel est l'intérêt des dosages quantitatifs ?

La technique d'immunodiffusion radiale convient pour doser des taux d'AFP détectables par la double immunodiffusion (supérieure à 10 mg/litre). La mise au point de la technique d'électroimmunodiffusion sur cellogel nous donne la possibilité de doser les taux d'AFP détectés par la technique de recherche plus sensible : l'immunodiffusion à contre courant sur cellogel. L'EID sur cellogel permet de doser des taux compris entre 1 mg/litre et 20 mg/litre. Nous avons exposé dans le tableau 28 la fréquence des taux d'AFP en fonction de la technique de dosage employée.

TABLEAU 28

DIAGNOSTIC	% AFP non dosable par EID	% AFP dosable par EID	% AFP dosable par IDR
	AFP < 1 mg/l	1 mg/l < AFP < 10 mg/l	AFP > 10 mg/l
HEPATOMES			
SERUM	2 %	33 %	65 %
ASCITE	0	2/3	1/3
EXT. de TUMEURS		2/3	1/3
CANCERS SECONDAIRES DU FOIE	66 %	28 %	6 %
CANCERS PRIMAIRES SANS METASTASE HEPATIQUE	85 %	15 %	0
HEPATITES	61 %	28 %	11 %
CIRRHOSES	93 %	7 %	0
AUTRES HEPATOPATHIES non cancereuses	100 %	0	0

Fréquence de l'AFP en fonction de la technique de dosage employée

Il apparait que l'IDR de MANCINI permet de doser l'AFP dans un grand nombre d'hépatomes (65 %) mais c'est grâce à l'EID que nous pouvons suivre l'évolution d'une hépatite. La plupart des cancers secondaires, la majorité des cirrhoses, des hépatopathies non cancéreuses présentent des traces non dosables par l'EID, donc inférieures à 1 mg/litre. Il parait difficile d'établir un diagnostic différentiel certain au seul vu de la concentration en AFP dans le sérum ; il semble toutefois qu'un taux très élevé oriente le plus vraisemblablement vers un hépatome. Chez des sujets adultes, une concentration d'AFP dans le sérum, in férieure à 10 mg/litre, si elle n'est plus pathognomonique d'un carcinome hépatocellulaire ou d'un tératome malin, reste cependant révélatrice d'un état pathologique (à l'exclusion, naturellement des cas de grossesse).

Les taux dans le liquide d'ascite sont toujours inférieurs à ceux du sérum correspondant et les extraits de tumeurs ont des concentrations encore plus faibles. Il faut souligner à nouveau tout l'intérêt des dosages pour suivre l'évolution d'une thérapeutique antimitotique. L'AFP est un critère de récidive ou d'extension des lésions néoplasiques, elle permet de mieux apprécier l'efficacité des gestes thérapeutiques et d'envisager une éventuelle réintervention en temps utile pour enlever une métastase encore opérable (96).

CONCLUSIONS

I – ETUDE ANALYTIQUE

L'alpha foetoprotéine a été détectée dans un certain nombre de sérums et liquides de ponction. Nous avons utilisé pour cela, la DOUBLE IMMUNODIFFUSION aujourd'hui classique et deux techniques d'IMMUNOELECTROPHORESE A CONTRE COURANT spécialement mises au point au cours de ce travail pour améliorer la sensibilité. Le seuil de détection a été abaissé à 0,25 mg/litre.

Ces résultats nous ont conduit à étudier une technique de dosage de l'alpha foetoprotéine plus sensible que l'IMMUNODIFFUSION RADIALE. En nous inspirant des travaux de LAURELL, nous avons mis au point une méthode d'ELECTROIMMUNODIFFUSION SUR CELLOGEL, dont le seuil de sensibilité est 1 mg/litre et qui permet de doser un taux de 12 mg/litre à ± 14 % près.

II – ETUDE PHYSIOPATHOLOGIQUE

Nous avons pu disposer d'un grand nombre de sérums prélevés sur des malades hospitalisés dans les services de Gastroenterologie.

Il nous a été possible
- de comparer la sensibilité des techniques employées
- d'établir le pourcentage de positivité de l'alpha foetoprotéine dans les cancers primitifs du foie (80 %)
- d'établir ce même pourcentage dans les autres hépatopathies.

Nous avons tenté d'établir une relation entre les affections et les concentrations correspondantes en alpha 1 foetoprotéine.

Vu, le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques,

Maurice CARRAZ

Le Président de la Thèse :

J. DORCHE

VU et permis d'imprimer
LYON, le 10.12.1973.

Le Président de l'Université
Claude-Bernard

Pour le Président
Le 1er Vice-Président

R. TOURAINE.

BIBLIOGRAPHIE

1 – *ABELEV G.I.*
Study of the antigenic structure of tumors
Acta Union Int. Cancer, 1963, 19, 80-82.

2 – *ABELEV G.I., PEROVA S.D. , KHRAMKOVA N.J., POSTNIKOVA Z.A., IRLIN I.S.*
Production of embryonal alpha globulin by transplantable mouse hepatomas.
Transplantation, 1963, 1 , 2, 174-180.

3 – *ABELEV G.I., ASSECRITOVA I.V., KRAEVSKY N.A., PEROVA S.*
Embryonal serum alpha globulin in cancer patients : Diagnostic value.
Int. J. Cancer , 1967, 2, 551-558.

4 – *ABELEV G.I.*
Production of embryonal serum alpha globulin by hepatomas : review of experimental and clinical data
Cancer Res. , 1968, 28, 1344-1350.

5 – *ABELEV G.I., ALPERT M.E. , HULL E.W. , MASSEYEFF R., de NECHAUD B., TATARINOV Y., URIEL J.*
Les protéines seriques foetospécifiques. Recommandations en vue d'une normalisation de la terminologie.
Bull. Org. Mond. Santé, 1970, 43, 311-312.

6 – *ABELEV G.I.*
Alpha fetoprotein production by normal liver and liver tumors.
In Protides of the Biological Fluids, 1970, 18, 203-209.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

7 – *ABELEV G.I.*
Alpha fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors.
Adv. in Cancer Res., 1971, 14, 295-357.

8 – *ABELEV G.I., TSVETKOV V.S. et Al.*
Assessment of the use of highly sensitive methods determining alpha fetoprotein for the diagnostic of hepato-cellular cancer and teratoblastoma
Bull. Exp. Biol. Med., 1971, 71, 75-81

9 – *ALPERT M.E., URIEL J., de NECHAUD B.*
Alpha 1 fetoprotein in the diagnosis of human hepatoma.
New Engl. J. Med., 1968, 278, 984-986

10 – *ALPERT M.E.*
Alpha 1 fetoprotein in human hepatomas
Clin. Res., 1969, 17, 461.

11 – ALPERT M.E., HUTT M.S.R., DAVIDSON C.S.
Primary hepatoma in Uganda
*Am. J. Med., 1969, **46**, 794-802.*

12 – ALPERT M.E., ZUCKERMAN J.
Absence of alpha 1 fetoprotein antigen or antibody in maternal sera.
*Lancet , 1970, **ii** , 465.*

13 – ALPERT M.E., MONROE M.,SCHUR P.
A method for increasing the sensitivity of radial immunodiffusion assay.
*Lancet, 1970, **i** , 1120*

14 – ALPERT M.E., SEELER R.
Alpha fetoprotein in embryonal hepatoblastoma.
J. Pediat, 1970, 77 , 1058-1060.

15 – ALPERT M.E., HERSHBERG. R., SCHUR. P., ISSELBACHER K.
Alpha fetoprotein in human hepatoma : improved detection in serum, and quantitative studies using a new sensitive technique.
*Gastroenterology , 1971, **61** , 137-143.*

16 – ALPERT M.E., PINN V.M., ISSELBACHER K.
Alpha fetoprotein in a patient with gastric carcinoma metastatic to the liver.
*New Engl J. Med., 1971, **285**, 1058-1059.*

17 – ALPERT M.E., STARLZL T., SCHUR P., ISSELBACHER K.
Serum alpha fetoprotein in hepatoma patients after liver transplantation.
*Gastroenterology, 1971, **61** , 144-148.*

18 – ALPERT M.E. , SCHUR P., DRYSDALE J., ISSELBACHER K.
Human alpha 1 fetoprotein : purification and physical properties.
*Fed Proc., 1971 , **30** , 246.*

19 – ALPERT M.E., DRYSDALE J.W., ISSELBACHER K.J., SCHUR P.H.
Human alpha fetoprotein. Isolation, characterisation and demonstration of microheterogeneity.
*J. Biol Chem., 1972, **247**, 3792-3798.*

20 – ALPERT M.E., COSTON R.L.
Evaluation of a rapid latex agglutination test for detection of alpha fetoprotein.
*Clin. Chem. 1973, **19**, 1069-1070*

21 – ALPERT M.E., ISSELBACHER K., DRYSDALE J.
Beta-fetoprotein : Identification as normal liver ferritin.
*Lancet , 1973 , **i** , 43-44.*

22 – ANDRIEU J., BREART G., RODIER B., ROBERT P.E.
A propos de l'existence de l'AFP en dehors de l'Hépatome.
*Presse Med., 1971 , **79** , 1595-1596.*

23 – BAGSHAWE A., PARKER A.M.
Age distribution de l'alpha fetoprotein in hepatocellular carcinoma.
*Lancet , 1970 , **ii** , 268.*

24 – BASSARD A., HUET M.J.
Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel : l'électrosynérèse.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 1959, 35, 258-260.

25 – BELANGER L., BELANGER M., LAROCHELLE L.
Une cirrhose infantile associée à la néoproduction d'alpha 1 foetoprotéine.
Nouv. Press. Med., 1972, 1, 1503-1504

26 – BELANGER L., BELANGER M., PRIVE L., LAROCHELLE, TREMBLAY M., AUBIN G.
Tyrosinémie héréditaire et alpha 1 foetoprotéine. I intérêt clinique de l'alpha foetoprotéine dans la tyrosinémie héréditaire.
Path. Biol., 1973, 21, 449-455.

27 – BELANGER L.
Tyrosinémie héréditaire et alpha 1 foetoprotéine. II recherche tissulaire comparée de l'alpha foetoprotéine dans deux cas de tyrosinémie héréditaire. Considérations sur l'ontogénèse de la foetoprotéine humaine.
Path. Biol., 1973, 21, 457-463.

28 – BERGMAN F.H., LEVINE L., SPIRO R.G.
Fetuin immunochemistry and quantitative estimation in serum.
Bicohim. Biophys. Acta, 1962, 58, 41-51.

29 – BERGSTRAND C.G., CZAR B.
Demonstration of a new protein fraction in serum from the human foetus.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1956, 8, 174.

30 – BERGSTRAND C.G., CZAR B.
Paper electrophoretic study of human fetal serum proteins with demonstration of a new protein fraction
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1957, 9, 277-286.

31 – BERNADES P.
Alpha 1 foetoprotéine et cancers digestifs en dehors de l'hépatome.
Ann. Gastroent. Hepatolog., 1971, 6, 561-564.

32 – BERNADES P., SMADJA M., RUEFF B., et COLL.
Présence de l'alpha foetoprotéine sérique dans quatre cas de cancers digestifs primitifs autres que l'hépatome.
Presse Med., 1971, 79, 1585-1587.

33 – BERNADES P., SCHLEGEL N., POTET F., MENACHE D.
Cancer de la vésicule biliaire avec alpha foetoprotéine.
Nouv. Press. Med., 1972, 1, 1291-1292.

34 – BERTRAND Ed., LEBRAS M., BEDA C.
A propos de 50 cas de cancer primitif du foie et notamment leur répartition géographique.
Bull. Soc. Path. Exotique. Fr., 1969, 62, 931-937

35 – BODMAN J.
Development of fetal proteins.
Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 103-109.

36 – BOURGEAUX C.
Etude de l'alpha foetoprotéine dans les affections testiculaires et hépatiques.
Ann. Gastroent. Hepatolog., 1971, 6 , 583-588.

37 – BOURGEAUX C., MARTIN F., CABANNE F., AUPELLE P., GUERRIN J.
Valeur pratique de l'alpha foetoprotéine dans le diagnostic et la surveillance post-opératoire des tumeurs embryonnaires du testicule
Press. Med., 1971, 79 , 1589-1590

38 – BOURGOIN J.J., SONNECK J.M., SIZARET P., LAVAL M.
La recherche systématique d'alpha 1 foetoprotéine chez des malades cancéreux.
Cah. Med. Lyonn., 1970, 46 , 3019-3023.

39 – BOURREILLE J., METAYER P., SAUGER F., MATRAY F., FONDIMARE A.
Existence d'alpha foetoprotéine au cours d'un cancer secondaire du foie d'origine gastrique.
Presse Med., 1970, 78 , 1277-1278

40 – BOURREILLE J.
Alpha 1 foetoprotéine et maladies non cancéreuses du foie.
Ann. Gastroent. Hépatolog. , 1971 , 6 , 565-570.

41 – BORDE J., MITROFANOFF P., GROSLEY M., BOURG M.
Présence d'alpha fétuine dans la régénération hépatique après hépatectomie réglée chez l'enfant.
Ann. Gastroentérol. Hépatol. (Paris), 1971, 7 , 589-590.

42 – BOREL-GIRAUD N., NYSSEN M., DORCHE J.
L'immunoélectrophorèse à contre courant sur cellogel : comparaison avec deux autres techniques immunochimiques.
Clin. Chim. Acta , 1973 , 49 , 169-175.

43 – BRANCH W.R.
The ontogeny of alpha fetoprotein in the fetal and neonatal rabbit and its experimental induction in adult rabbits.
Int. J. Cancer , 1972, 10 , 451-457.

44 – BROCK D.J., SUTCLIFFE R.G.
Alpha fetoprotein in the antenatal diagnosis of anancephaly and spina bifida
Lancet , 1972 , ii , 197-199.

45 – BUFFE D.
Recherche de l'alpha foetoprotéine dans les tumeurs hépatiques et dans les affections métaboliques de l'enfant.
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972, 61 , 20c.

46 – BUFFE D., RIMBAUT C.
L'alpha foetoprotéine dans les atteintes hépatiques et les maladies métaboliques de l'enfant.
Biomed., 1973 , 19 , 172-176.

47 – BURTIN P., VON KLEIST F., BUFFE D.
Etudes sur les antigènes foetaux humains I Etude immunoélectrophorétique des antigènes du sérum humain foetal absents du sérum adulte.
Bull. Soc. Chim. Biol. , 1967 , 49 , 1389-1398.

48 – BURTIN P.
Foetoprotéines et Hépatomes.
*Rev. Franc. Etud. Clin. Biol., 1969 , **14** , 563-565.*

49 – BURTIN P.
Les protéines spécifiques des cancers humains
*Nouv. Rev. Fr. Hémato., 1970 , **10** , 335-338.*

50 – CAROLI J.
Valeur comparée de la recherche de l'alpha 1 foetoprotéine et du double marquage à l'or et à la sélénométhionine en scintigraphie dans le diagnostic des cancers du foie.
*Ann. Gastroent. Hépatolog., 1971, **6** , 577-582.*

51 – CAVA LLERO F., CHELI R.
L'alpha fetoproteina nelle malattie del fegato e nei tummi extra-epatici .
*Min., Med., 1972 , **63** , 2475-2477.*

52 – CHAYVIALLE J.A.P., GANGULI P.C.
Radioimmunoassay of alpha fetoprotein in human plasma.
*Lancet, 1973 , **i** , 1355-1357.*

53 – CLARK J.V.
Serum alpha 1 fetoprotein in liver disease.
*Lancet, 1970 , **i** , 88.*

54 – CLARK J.V.
Assessment of fetal and cord blood, amniotic fluid and hepatoma patient's blood for three antigens
*in Protides of the biological fluids , 1970, **18** , 235-238.*
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

55 – CLERC M., BERTRAND E., LEBRAS M.
Intérêt diagnostique de la recherche de la fétuine dans les cancers primitifs du foie.
*Ann. Univ. Abidjan (Méd.), 1971, **5** , 158-163.*

56 – COHEN H., GRAHAM H., LORRIN LAU H.
Alpha 1 fetoprotein in pregnancy.
*Am . J. Obstet. Gynecol., 1973, **115** , 881-883.*

57 – CORLIN R.F., TOMPKINS R.K.
Serum alpha 1 fetoglobulin in a patient with hepatic metastases from bronchogenic carcinoma.
*Dig. Dis., 1972, **17** , 553-555.*

58 – DARCY D.A.
A general method of increasing the sensitivity of immunodiffusion ; its application to C E A.
*Clin. Chim. Acta, 1972, **38** , 329-337.*

59 – DAVIS B.J.
Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins.
*Ann. New-York, Acad., Sc., 1964 , **121** , 404-427.*

60 – DEGAND P.
Recherche et dosage d'antigènes foetaux (alpha 1 foetoprotéine) et d'antigènes d'origine virale (antigène Au/SH ou Antigen Australia).
Le Pharmacien Biologiste , 1972 , 7 , 728-731

61 – DENIS P.
Alpha foetoprotéine et hépatopathies
Thèse Med., 1972, Rouen.

62 – DIEBOLD N., NEZELOF C.
La synthèse hépatique d'alpha 1 foetoprotéine : etude topologique en immunofluorescence dans un cas de cirrhose infantile.
Nouv. Press. Med., 1973 , 2 , 1769-1772

63 – DOMMERGUES J.P., ODIEVRE M., BUFFE D., NOCTON F.
Synthèse prolongée d'alpha foetoprotéine chez deux frères atteints de tyrosinose congénitale
Arch. Franç. Pédiat. , 1972 , 29 , 737-744.

64 – DUVAL C., HEMET J., LAUMONIER R.
Alpha 1 foetoprotéine. Exposé introductif anatomopathologique.
Ann. Gastroentérol. Hépatol., 1971, 6 , 543-548.

65 – ECONOMOPOULOS P., THEODOROPOULOS C., SAKELLA-ROPOULOS N.
Alpha fetoprotein in Greece and France.
Lancet , 1970, ii , 1337

66 – ELGORT D.A., ABELEV G.I.
Détermination immunoélectroradiologique chez les animaux et l'homme.
Bull. Exp. Biol. Med., 1971, 2 , 118-119.

67 – ELGORT D.A., ABELEV G.I., O' CONOR G.T.
Dependence of the specificity of the serologic test for primary liver cancer in different areas of the world on sensitivity of the method used for detecting alpha fetoprotein.
Int. J. Cancer , 1972 , 10 , 331-337.

68 – ENGELHARDT N.V., GOUSSEV A.L., SHIPOVA J., ABELEV G.I.
Immunofluorescent study of alpha fetoprotein in liver tumours.
Int. J. Cancer, 1971 , 7 , 198-206.

69 – FINKLESTEIN J.Z., HIGGINS G.R., FAUST J., KARON M.
Serum fetoprotein and malignancy in children.
Lancet, 1972 , 30 , 1 , 80-83.

70 – FOLI A.K., SHERLOCK S.
Serum alpha 1 fetoprotein in patients with liver disease.
Lancet, 1969, ii , 1267-1269.

71 – FOY H., KONDI A., LINSELL C.A., PARKER A.M., SIZARET P.
Positive alpha 1 fetoprotein tests in pyrodoxine deprived baboons : relevance to liver carcinoma in Africans
Nature, 1970, 225 , 952-953.

72 – FOY H., KONDI A., LINSELL C.A.
Fetoprotein in pregnant africa women.
*Lancet , 1970 , **i** , 663-664.*

73 – FOY H., KONDI A., PARKER A.M., STANLEY R., VENNING C.
The alpha fetoprotein test in pregnant women , women on oral contraceptives, new born babies, and pyridoxine deprived baboons
*Lancet , 1970 , **ii** , 1336-1337.*

74 – GAJDOS A.
L'alpha foetoprotéine.
Nouv Press. Med. , 1973 , 2 , 987-991

75 – GALDO A., CASADO J.P., TALAVERA R.
Démonstration dans le sérum de foetus humain d'une nouvelle fraction protéique au moyen de l'électrophorèse sur papier
*Arch. Fr. Pediat., 1959, **16** , 954-962.*

76 – GEFFROY Y., DENIS P., COLIN R., SAUGER F., MATRAY F., FONDIMARE A.
Présence d'alpha 1 foetoprotéine chez l'adulte au cours d'une hépatite virale traitée par cortico-thérapie
*Presse Med. , 1970 , **78** , 1107-1108.*

77 – GEFFROY Y., METAYER P., DENIS P., PHILIPPE J., METRAY F., SAUGER F., LAUMONIER R., DUVAL C.
Alpha foetoprotéine et cancer secondaire du foie.
*Presse Med , 1970 , **78** , 1896.*

78 – GEFFROY Y., BOUREILLE J., DENIS P., COLIN R., METAYER P.
Bilan d'une recherche systématique de l'alpha foetoprotéine dans 224 hépatopathies.
*Sem. Hop. Paris, 1971 , **47** , 1281-1285.*

79 – GEFFROY Y., COLIN R., DENIS P., GALMICHE J.P., HUMBERT G.
Alpha foetoprotéine dans deux cas d'hépatite virale.
Nouv. Press. Med., 1973, 2 , 584.

80 – GILL C., FISCHER C., HOLLEMAN C.
Rapid method for protein quantitation by electroimmunodiffusion.
*Clin. Chem., 1971 , **17** , 501-504*

81 – GIRARD M., NYSSEN M., CHAPUY H., SAMBIN P.
Alpha 1 foetoprotéine. Rapport d'une enquête personnelle.
*Ann. Gastroent. Hépatolog. , 1971 , **6** , 571-575.*

82 – GITLIN B., BOESMAN M.
Serum alpha fetoprotein, albumin and gamma globulin in the human conceptus.
*J. Clin. Invest., 1966 , **45** , 1826-1838.*

83 – GITLIN D., BOESMAN M.
Sites of serum alpha fetoprotein synthesis in the human and in the rat.
*J. Clin. Invest., 1967 , **46** , 1010-1016.*

84 – GITLIN D., BOESMAN M.
Foetus specific serum proteins in several mammals and three relation to human alpha foetoprotein.
Comp. Biochem. Physiol., 1967 , 21 , 327-336.

85 – GITLIN D.
Sites of alpha fetoprotein synthesis
New Eng. J. Med., 1971 , 285 , 1436-1437.

86 – GITLIN D., PERRICELLI A., GITLIN G.M.
Synthesis of alpha fetoprotein by liver, yolk sac and gastrointestinal tract of the human conceptus.
Cancer, Res., 1972 , 32 , 979-982.

87 – GOCKE D.J., CALDERON H.
Rapid detection of Australia antigen by counter immunoelectrophoresis.
J. Immun., 1970 , 104 , 1031-1032.

88 – GOUSSEV A., JASOVA A.K.
An effective method of obtaining antisera to embryonal alpha globulins of man and animals.
Bull. Exp. Biol. Med., 1970 , 4 , 120-122.

89 – GOUSSEV A.I., ENGELHARDT N.V., MASSEYEFF R., CAMAIN R., BASTERIS P.
Immunofluorescent study of alpha fetoprotein in liver and in liver tumours. II Localization of alpha fetoprotein in the tissues of patients with primary liver cancer.
Int. J. Cancer, 1971 , 7 , 207-217.

90 – GRABAR P.
Introductory remarks on foetal proteins and their reapparence in tumors.
in Protides of the Biological Fluids, 1970 , 18 , 201-202
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

91 – GUIBAUD S., BONNET M., THOULON J.M., DUMONT M.
Alpha fetoprotein in amniotic fluid
Lancet, 1973 , i , 1261.

92 – HAYEM-LEVY A.
Techniques de dosage des protéines sériques par immunodiffusion
Le Pharmacien Biologiste , 1972 , 7 , 691-695.

93 – HERSH T., HOLLINGER F.B., GOYAL R.K., GRUBB M.N., MELNICK J.L.
Australia antigen and antibody and alpha fetoglobulin in hepatoma patients.
Int. J. Cancer , 1971 , 8 , 259-263.

94 – HIRCH-MARIE H., CONTE M.
Présence et signification de l'alpha foetoprotéine dans le sérum.
Sem. Hop. Paris, 1970 , 46 , 3057-3063.

95 – HIRSCH-MARIE H.
Quelle est la signification de l'alpha foetoprotéine ? Quelle est la fréquence de cette observation ?
Vie Médicale , 1972 , 38 , 4929 et 4933.

96 – HIRSCH-MARIE H., HUGUET C.
L'alpha foetoprotéine (AFP) dans les cancers primitifs du foie.
Intérêt de l'étude quantitative.
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972 , 61 , 463-472.

97 – HIRSCH-MARIE H., HUGUET C.
Quantitative Determination of the alpha fetoprotein (AFP).
Digestion , 1972 , 7 , 156-164.

98 – HUGUIER M., HIRSCH-MARIE H.
Hépatome sur cirrhose.
Nouv. Press. Med., 1972, 1 , 2905-2906.

99 – HULL E.W., CARBONE P.P., GITLIN D., O'GARA R.W., KELLY M.G.
Alpha fetoprotein in monkeys with hepatoma.
J. Nat. Cancer Inst., 1969 , 42 , 1035-1044.

100 – HULL E.W., MOERTEL C.G., CARBONE P.P.
Serum alpha fetoprotein in cancer patients
Cancer Res., 1969 , 17 , 403.

101 – HULL E.W., CARBONE P.P., MOERTEL C.G., O'CONOR G.T.
Serum alpha fetoprotein in U.S.A.
Lancet , 1970 , i , 779.

102 – KAHAN B., LEVINE L.
The occurence of a serum alpha 1 protein in developping mice and murine hepatomas and teratomas
Cancer Res. , 1971 , 7 , 930-936.

103 – KANG K.Y., HIGASHINO K., YAKAHASHI Y., HASHINOTSUME M., TAMAMURAM Y.
Alpha fetoprotein in infantile diseases.
Clin. Chim. Acta , 1972 , 42 , 175-180.

104 – KIRSH I., WISE R., OLIVIER I.
Post albumin, alpha foetal specific rat plasma protein. Purification, physiochemical and immunological studies.
Biochim. J., 1967 , 102 , 763-766.

105 – KITAGAWA R., YOKOCHI T., SUGANO H.
Alpha fetoprotein and hepatocarcinogenèsis in rats fed 3' methyl-4 azobenzene or N'2 fluoroenylacetamide.
Int. J. Cancer , 1972 , 10 , 368-381.

106 – KITAOKA H., HATTORI N. and MUKOJIMA T.
Alpha fetoprotein and metastatic hepatic cancer. Its relation ship to histological findings.
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972 , 61 , 19 c.

107 – KITHIER K., MASOPUST J., RADL J.
Fetal alpha globulin of bovin serum differing from fetuine.
Biochim. Biophys. Acta , 1968 , 160 , 135-137.

108 – KITHIER K., LUSHER J., BROUGHT J., POULIK M.D.
Effect of therapy on the serum level of alpha 1 fetoprotein in embryonal cell carcinoma.
J. Pediat., 1972 , 81 , 71-75.

109 – KOHN J.
Method for the detection and identification of alpha fetoprotein in serum.
J. Clin. Path., 1970 , 23 , 733-735.

110 – KOHN J.
Alpha fetoprotein determination in a Clinical laboratory.
8th International Congress on Clinical Chemistry.
Copenhagen 18-23 Juin 1972.

111 – KOZOWER M., FAWAZ K.A., MILLER H.M., KAPLAN M.M.
Positive alpha fetoglobulin in a gastric carcinoma.
New Engl. J. Med., 1971 , 285 , 1059-1060.

112 – KRESNO S.B., GANDOSOEBRATA R., RUMKE Ph.
Serum alpha fetoprotein in Indonesia.
Lancet , 1970 , i , 1178.

113 – KRESNO S.B., GANDOSOEBRATA R., RUMKE Ph.
Serum alpha fetoprotein in patients with hepatoma from Djakakta.
in Protides of the Biological Fluids , 1970 , 18 , 243-245.
Elsevier Publishing Company , Amsterdam.

114 – LARDINOIS R., AGNAGNOSTAKIS D., ORTIZ M.A., DELISLE M.
Human alpha 1 fetoprotein during the last trimester of gestation.
Clin. Chim. Acta, 1972 , 37 , 81-90.

115 – LAURELL C.B.
Antigen antibody crossed electrophoresis.
Ann. Biochim., 1965 , 10, 358.

116 – LAURELL C.B.
Quantitative estimation of protein by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Ann. Biochim., 1966 , 15 , 45-52.

117 – LEBAS J.
Techniques d'électroimmunodiffusion quantitatives.
Le Pharmacien Biologiste , 1972 , 7 , 697-702.

118 – LEBLANC L., TUYNS A.J., MASSEYEFF R.
Screening for primary liver cancer. The relation ship between the time of appearance of alpha fetoprotein in the serum and clinical symptoms in nine cases.
Digestion, 1973 , 8 , 8-14.

119 – LEHMANN F.G., LEHMANN D., und MARTINI G.A.
Alpha Fetoprotein. Isoliering und Kristallisation aus Menschhlichem plasma.
Clin. Chim. Acta, 1971 , 33 , 197-206.

120 – LEHMANN H.E.
Kristallisation von alpha 1 Fetoprotein aus dem Plasma eines Patienten mit primärem Leberzellcarcinom.
Klin. Wschz., 1971, 49 , 609-611.

121 – LEHMANN F., LEHMANN D.
Alpha 1 fetoprotein . quantitative determination and new immunologic techniques.
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972 , 61 , 16 c.

122 – LEHMANN F.G., LEHMANN D.
Neigleich verschiedener Methoden zum serologischen Nachweis von alpha Foetoprotein in Serum.
Z. Klin. Chem., 1973 , 11 , 339-347.

123 – LINDER E., WIDHOLM O.
Demonstration of alpha fetoprotein in an ovulogenic tumor of the ovary.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968 , 101 , 38-40.

124 – LINDER E., LAHTI A., SAXEN L.
Immunofluorescent localization of a fetal protein in the mouse yolk sac.
Int. Arch. Allergy , 1971 , 40 , 411-418.

125 – MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F.
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry , 1965, 2 , 235-254.

126 – MARTIN J.P.
La technique de préparation des antisérums précipitants.
Ann. Gastroent. Hépatol., 1971 , 6 , 541-542.

127 – MASOPUST J., KOTAL L.
Fetoprotein · Immunochemical behaviour of a autonomous fetal component in sera from human fetuses.
Ann. Pediat., 1965 , 284 , 138-140.

128 – MASOPUST J., KITHIER K., RADL J., KOUTECKY S., KOTAL L.
Occurence of fetoprotein in patients with neoplasma and no neoplastic diseases.
Int. J. Cancer , 1968 , 3 , 364-373.

129 – MASOPUST J., TOMASOVA H., KOTAL L.
Some physicochemical characteristics of human alpha 1 fetoprotein.
in Protides of the Biological Fluids , 1970 , 18 , 37-42.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

130 – MASOPUST J., ZIZKOVSKY V., KITHIER K.
Fetoprotein in different species of mammals.
in Protides of the Biological Fluids, 1970 , 18 , 63-73.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

131 – MASOPUST J., RADL J., HOUSTEK J.
Occurence of alpha 1 fetoprotein in some infants suffering from hepatopathy.
in Protides of the Biological Fluids , 1970 , 18 , 239-242.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

132 – MASSEYEFF R., SANKALE M., ONDE M., MENYE A., CAMAIN R., QUENUM C., MAYDAT L., MATTERN P., ANCELLE J.P., LEBLANC L.
Valeur de la recherche de l'alpha 1 foetoprotéine sérique pour le diagnostic du cancer primitif du foie.
Bull. Soc. Med. Afr. Noire Lgue Fr., 1968, 13 , 537-548.

133 – MASSEYEFF R., BASTERIS B., LEBLANC L.
Use of the alpha fetoprotein test for the diagnosis of primary liver cancer.
in Protides of the Biological Fluids , 1970, 18 , 217-220.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

134 – MASSEYEFF R., BONET C., LAFON J., DELMONT J.
Intérêt en hépatologie du dosage radioimmunologique de traces d'alpha foetoprotéine.
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972 , 61 , 17 c.

135 – MASSEYEFF R.
Human alpha fetoprotein
Path. Biol., 1972 , 20 , 703-725.

136 – MATRAY F., SAUGER F., BORDE J., MITROPANOFF P., GROSLEY M., BOURG M., LAUMONIER R., HEMET J.
Présence d'alpha foetoprotéine au cours d'une régénération hépatique après hépatectomie gauche pour hépatome chez un enfant.
Path. Bio., 1972, 20, 353.

137 – MAWAS C., KOHEN M., LEMERLE J., BUFFE D., SCHWEISGUTH O., BURTIN P.
Serum alpha 1 fetoprotein in children with malignant ovarian or testicular teratomas.
Int. J. Cancer , 1969, 4 , 76-79.

138 – MAWAS C., BUFFE D., LEMERLE J., SCHWEISGUTH O., BURTIN P.
Recherche immunologique de l'alpha foetoprotéine ou fétuine dans les tumeurs primitives du foie et les tératomes malins de l'enfant. (à propos de 18 cas positifs).
Arch. Franç. Ped., 1969, 26 , 779-790.

139 – MAWAS C., BUFFE D., BURTIN P.
Influence of age on a fetoprotein incidence.
Lancet , 1970 , i , 1292.

140 – MAWAS C., BUFFE D., SCHWEISGUTH O., BURTIN P.
Alpha fetoprotein and children's cancer.
Rev. Europ. Etud. Clin. Biol., 1971, 16 , 430-435.

141 – Mc INTIRE K.R. , VOGEL E.L., PRINCIER G.L.
Serum alpha fetoprotein as a biochemical marker for hepatocellular carcinoma.
Cancer Res., 1972 , 32 , 1941-1946.

142 – MEHLMAN D.J., BULKLEY B.H., WIERNIK P.H.
Serum alpha 1 feto-globulin with gastric prostatic carcinomas.
New Engl. J. Med., 1971 , 285 , 1060-1061.

143 – de MURALT G., ROULET D.L.A.
Etude immunologique des protéines sériques foetales humaines.
Helv. Paediat. Acta, 1961, 16 , 517-533.

144 – NAYAK N.C., MALAVIYA A.N., CHANLAY VEENA M.B., CHANDRA R.K.
Alpha 1 fetoprotein in Indian childhood cirrhosis.
Lancet , 1972, 1 , 68.

145 – de NECHAUD B., ECONOMOPOULOS P., URIEL J.
Fréquence d'apparition de foetoprotéines dans le sérum de malades atteints d'hépatopathies diverses.
Presse Med., 1969, 77 , 1945-1947.

146 – de NECHAUD B., URIEL J.
Antigènes cellulaires transitoires du foie de rat. I sécrétion et synthèse des protéines sériques foetospécifiques au cours du développement et de la régénération hépatique.
Int. J. Cancer , 1971 , 8 , 71-80.

147 – de NECHAUD B., URIEL J.
Antigènes cellulaires transitoires du foie de rat. II Effet des inhibiteurs de synthèse sur les foetoprotéines sériques à la fin du premier mois de vie et après intoxication hépatique aigüe.
Int. J. Cancer, 1972 , 10 , 58-71.

148 – de NECHAUD B., URIEL J.
Antigènes cellulaires transitoires du foie de rat. III Mode de réapparition de l'alpha foetoprotéine au cours de l'hépatocarcinogénèse chimique.
Int. J. Cancer, 1973 , 11 , 104-115.

149 – NISHI S.
Isolation and characterization of a human fetal alpha globulin from the sera of fetuses and a hepatoma patient.
Cancer Res., 1970, 30, 2507-2513.

150 – NISHI S., HIRAI H.
Purification and chemical characterization of human alpha fetoprotein
in Protides of the Biological Fluids , 1970, 18 , 43-47.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

151 – NISHIOKA M., TAKAYOSHI I., KIWAMU O., HARADA T., FUJITA T.
Localization of alpha fetoprotein in hepatoma tissues by immunofluorescence.
Cancer Res., 1972 , 32 , 162-166.

152 – NISHIOKA M., OKITA K., OKAMOTO Y., KODAMA T., FUJITA T.
Comparison of various precipitin tests in the detection of alpha fetoprotein in serum.
Digestion, 1972, 6 , 205-209.

153 – NORGAAD-PEDERSEN B.
Purification and sensitive immunoelectrophoretical detection and quantitation of human alpha 1 fetoprotein.
Clin. Chim. Acta, 1972 , 38 , 163-170.

154 – NUNEZ E., ENGELMANN F., BENASSAY G., JAYLE M.F.
Identification et purification préliminaire de la foetoprotéine liant les oestrogènes dans le sérum de rats nouveaux nés.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 1971 , 273 , 242-245.

155 – NYSSEN M.
L'alpha 1 foetoprotéine.
Le Pharmacien Biologiste , 1972 , 7 , 925-932.

156 – OAKES D.D., SHUSTER J., GOLD P.
Radioimmunoassay for alpha 1 fetoprotein in serum of rats.
Cancer Res., 1972 , 32 , 2753-2760.

157 – O'CONOR G.T., TATARINOV Y.S., ABELEV G.I., URIEL J.
A collaborative study for the evaluation of a serologic test of primary liver cancer.
Cancer , 1970 , 25 , 1091-1098.

158 – OLOVNIKOV A.M., TSVETKOV B.C.
Detection of the embryonal alpha-globulin by the method of aggregate hemaglutination in the sera of patients with human cancer
Bull. Exp. Biol. Med., 1969 , 68 , 102-104.

159 – ORNSTEIN L.
Disc electrophoresis. I Background and theory.
Ann. New-York Acad. Sc., 1964, 121 , 321-349.

160 – OUCHTERLONY O.
Antigen-antibody reactions in gel.
Acta Path. Microbiol. Scand., 1949, 26 , 507-515.

161 – OUCHTERLONY O.
Diffusion in gel : methods for immunological analysis.
Progr. Allergy , 1958, 5 , 1.

162 – PIARD A., MABILLE J.P., PUTELAT R., MICHIELS R., RIFLE C., JUSTRABO E., BOURGEAUX C., JUGLARET M.
Syndrôme paranéoplasique à manifestations multiples révélateur d'un hypernéphrome avec présence d'alpha foetoprotéine.
Sem. Hôp. Paris, 1973 , 49 , 341-346.

163 – PIZZOLATO M.A.
Two dimensional immunoelectrophoresis on cellulose acetate : improved method for routine protein estimation.
Clin. Chim. Acta, 1973 , 45 , 207-214.

164 – PEDERSEN K.O.
Fetuin : a new globulin isolated from serum.
Nature, 1944, 154 , 575.

165 – PORTUGAL M.L., AZEVEDO M.S., MANSO C.
Serum alpha fetoprotein and variant alkaline phosphatase in human hepatocellular carcinoma.
Int. J. Cancer, 1970, 6 , 383-387.

166 – PRINCE A.M., BURKE K.
Serum hepatitis antigen (S H) : Rapid detection by high voltage immunoelectrophoresis.
Science, 1970, 169 , 593-595.

167 – PURVES L.R., MAC NAB M., BERSOHN I.
Fetoglobulin and primary liver cancer.
Lancet, 1968 , ii , 634.

168 – PURVES L.R., MAC NAB M., BERSOHN I.
Serum alpha fetoprotein I Immunodiffusion and immuno-assay results in cases of primary cancer of the liver
S. Afr. Med. J., 1968, 42 , 1138-1141

169 – PURVES L.R., MAC NAB M., GEDDES E.W., BERSOHN I.
Serum alpha fetoprotein and primary hepatic cancer.
Lancet , 1968, i , 921-922

170 – PURVES L.R., BERSOHN I.
Serum alpha fetoprotein. II Correlation of serum levels with other biochemical parameters in primary cancers of the liver
S. Afr. Med. J., 1969, 43 , 1110-1113

171 – PURVES L.R., BERSOHN I.
Radioimmunoassay of alpha fetoprotein.
Proc. Sth. Afr. Ass. Path., 1969, 67, 140.

172 – PURVES L.R., BERSOHN I., GEDDES E.W.
Serum alpha fetoprotein and primary cancer of the liver in man.
Cancer, 1970, 25, 1261-1270.

173 – PURVES L.R., VAN DER MERWE E., BERSOHN I.
Variants of a fetoprotein
Lancet , 1970, ii , 464-465.

174 – PURVES L.R., VAN DER MERWE E., BERSOHN I.
Serum alpha fetoprotein. V The bulk preparation and some porperties of alpha fetoprotein obtained from patients with primary cancer of the liver.
S. Afr. Med. J., 1970, 44 , 1264-1268.

175 – RAPP W., LEHMANN H.E.
Nachweis des alpha Fötoproteins in menschlichem tumor Ascites und seine partielle Isolierung.
Clin. Chim. Acta, 1971, 31 , 45-53.

176 – ROWE D.
Radioactive single radial immunodiffusion : a method for increasing the sensitivity of immuno-chemical quantification of proteins in agar gel.
Bull. Org Mond. Santé , 1969 , 40 , 613-616.

177 – RUOSLAHTI E., SEPPALA M.
Studies of carcino fetal proteins physical and chemical properties of human alpha fetoprotein.
Int. J. Cancer, 1971, 7 , 218-225.

178 – RUOSLAHTI E., SEPPALA M., PIHKO H., VUOPIO P.
Studies of carcinofetal proteins. II Biochemical comparison of alpha fetoprotein from human fetuses and patients with hepatocellular cancer.
Int. J. Cancer , 1971 , 8 , 283-288

179 – RUOSLAHTI E., SEPPALA M.
Studies of carcino-fetal proteins. III Development of a radioimmuno-assay for alpha fetoprotein in serum of healthy human adults
Int. J. Cancer , 1971 , 8 , 374-383

180 – RUOSLAHTI E., SEPPALA M.
Alpha fotoprotein in normal serum.
Nature, New Biol., 1972 , 235 , 161-162.

181 – RUOSLAHTI E., SEPPALA M.
Normal and increased alphafetoprotein in neoplastic and non neoplastic liver disease.
Lancet , 1972 , ii , 278-279.

182 – SANCHEZ-CUENCA J.M., SALA T., RODRIGO M., GARRIDO G., BAGUENA J., BERENGUER J.
Diagnostic immunologique du C.H.P.
Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972 , 61 , 21 c.

183 – SANKALE M.
Alpha 1 foetoprotéine et cancer primitif du foie.
Ann. Gastroent. Hepatol., 1971 , 6 , 551-560.

184 – SANKALE M., MASSEYEFF R., CAMAIN R., QUENUM C., ANCELLE J.P., LEBLANC L.
Le diagnostic du carcinome primitif du foie par la mise en évidence dans le sérum d'une alpha 1 globuline embryonnaire.
Presse Med., 1968 , 76 , 2047-2049.

185 – SAUGER F., DUVAL C., FONDIMARE A., MATRAY F., BUFFE D.
Systematic analysis of alpha fetoprotein in 5 000 sera.
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. , 1971 , 16 , 471-473.

186 – SAUGER F., MATRAY F.
L'alpha 1 foetoprotéine humaine. Intérêt clinique de sa recherche.
Sci. Med., 1971, 2 , 3, 263-268.

187 – SAUGER F., MATRAY F.
L'alpha 1 foetoprotéine. Exposé introductif biologique.
Ann. Gastroent. Hépatolog., 1971 , 6 , 533-539.

188 – SELL S., JALOWAYSKI I., BELLONE C., WEPSIC H.T.
Isolation et characterization of rat alpha 1 fetoprotein.
Cancer Res., 1972 , 32 , 1184-1189.

189 – SELLER M.J., CAMPBELL S.T., COLTART T.M., SINGER J.D.
Early termination of anencephalic pregnancy after detection by raised alpha fetoprotein levels.
Lancet, 1973, i , 73.

190 – SEPPALA M., RUOSLAHTI E.
Alpha 1 fetoprotein in normal and pregnancy sera.
Lancet, 1972 , i , 375.

191 – SEPPALA M., RUOSLAHTI E.
Radioimmunoassay of maternal serum during pregnancy and delivery.
Obstetrics , 1972, 112 , 208-212.

192 – SEPPALA M., BAGSHAWE K.D., RUOSLAHTI E.
Radioimmunoassay of alpha fetoprotein : a contribution to the diagnosis of choriocarcinoma and hydatiform mole.
Int. J. Cancer, 1972 , 10 , 478-481.

193 – SEPPALA M., RUOSLAHTI E.
Alpha fetoprotein in amniotic fluid : an index of gestational age.
Ann J. Obstet. Gynecol. , 1972 , 114 , 595-598.

194 – SEPPALA M., RUOSLAHTI E.
Alpha fetoprotein in antenatal diagnosis.
Lancet, 1973, 20 , 155.

195 – SIMON A.
Difficulté du diagnostic du cancer primitif du foie.
G M. de France , 1969, 76 , 4753-4758.

196 – SIZARET P.P. , Mc INTIRE K.R., PRINCIER G.L.
Quantitation of human alpha fetoprotein by electroimmunodiffusion.
Cancer Res., 1971, 31 , 1899-1902.

197 – SIZARET P., MARTEL N., ANDERSON S.G.
Some problems pertaining to the standardisation of alpha fetoprotein.
Arch. Fr., Mal. App. Dig., 1972 , 61 , 18 c.

198 – SIZARET P. MARTIN F., BOURGEAUX C.
Non specific Immunologic precipitin reactions in alpha fetoprotein determination.
Digestion, 1973 , 8 , 15-21.

199 – SMITH J.B., ROBINSON K.V.
Influence of age on alpha fetoprotein incidence.
Lancet , 1970, i , 1292.

200 – SMITH J.B.
Occurence of alpha fetoprotein in acute viral hepatitis.
Int. J. Cancer, 1971, 8 , 421-424.

201 – SMITH J.B., O'NEILL R.T.
Alpha fetoprotein. Occurence in germinal cells and liver malignancies.
Amer. J. Med. , 1971 , 51 , 767.

202 – SMITH J.B.
Alpha fetoprotein. A possible factor necessary for normal development of the embryo.
Lancet, 1972, i , 851.

203 – SPIRO R.G.
Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. Isolation, chemical composition and physico-chemical properties.
J. Biol. Chem. , 1960, 235 , 2860-2869.

204 – STANISLAWSKI-BERENCWAJG M., FRAYSSINET C., GRABAR M.
Embryonnic antigens in liver tumours in rats.
Arch. Immun. Ther. Exp., 1966, 14 , 730-736.

205 – TASQUE J.P.
L'alpha foetoprotéine dans les maladies du foie de l'adulte.
Thèse Med., 1972 , LYON.

206 – TAKAHASHI A., YACHI A., ANZAI T., WADA T.
Presence of a unique serum protein in sera obtained from patients with neoplasis and in embryonnic and neonatal sera.
Clin. Chim. Acta , 1967 , 17 , 5-11.

207 – TATARINOV Y.S.
Presence of monospecific alpha globulin in the serum of patients with primary hepatocellular carcinoma.
Vop. Med., Khim., 1964 , 10 , 90-91.

208 – TATARINOV Y.S.
New data on the embryon specific antigenic comparents of human blood serum.
Fed. Proc., 1965 , 24 , 916.

209 – TATARINOV Y.S.
Variations of embryospecific globulins of human sera in fetuses and new borns.
Nature , 1968 , 217 , 964 .

210 – TERES J., BERTRAN A., MAS A., GRAS J.
Alpha fetoprotein in Spain.
Lancet , 1970, ii , 465.

211 – TIEN-YU-LIN., SHU-HSUNCHU., MIIN-FUCHEN., CHENG-HSIUNG CHEN.
Serum alpha fetoglobulin and primary cancer of the liver in Taiwan.
Cancer, 1972, 30 , 435-443.

212 – URIEL J., de NECHAUD B., STANISLAWSKI M., MASSEYEFF R., LEBLANC L., QUENUM C., LOISILLIER F., GRABAR P.
Antigenes embryonnaires et cancer du foie chez l'homme. Association de l'alpha 1 foetoprotéine avec hépatome primaire.
C.R. Acad. Sci. (Paris) , 1967 , 265 D , 75-78.

213 – URIEL J., de NECHAUD B.
Association d'antigènes embryonnaires avec l'hépatome primaire chez l'homme et les animaux de laboratoire.
Rev. Med. Fr. , 1968 , 43 , 1.

214 – URIEL J., de NECHAUD B., STANISLAWSKY-BERENCWAJG M., MASSEYEFF R., LEBLANC L., QUENUM E., LOISILLIER F., GRABAR P.
Le diagnostic du cancer primaire du foie par les méthodes immunologiques.
Presse Med., 1968 , 76 , 1415-1417.

215 – URIEL J.
Transitory liver antigens and primary hepatoma in man and rat.
Path. Biol., 1969, 17 , 877-884.

216 – URIEL J.
Transitory liver antigens and primary hepatoma.
in Protides of Biological fluids , 1970 , 18, 211-215
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

217 – URIEL J., de NECHAUD B.
La recherche d'alpha foetoprotéine en pathologie humaine . Etat actuel de la question.
Ann Inst. Pasteur, Paris, 1972 , 122 , 829-839.

218 – URIEL J., de NECHAUD B., DUPIERS M.
Estrogen-binding properties of rat, mouse and man fetospecific serum proteins Demonstration by immunoradiographic methods.
Biochem. Biophys. Res. Commun , 1972 , 46 , 1175-1179.

219 – VARMA R.R. , HOSTY T.A.
Detection of alpha fetoprotein
Gastroenterology , 1972 , 63 , 530-531.

220 – VERGANY C., PIZZOLATO M., DIOGUARDI N.
Alpha fetoprotein in Italy.
Lancet, 1972 , i , 449

221 – WADA T., ANZAI T., YACHI A., TAKAHASHI A., SAKAMOTO S.I.
Incidences of three different fetal proteins in sera of patients with primary hepatoma.
in Protides of the biological fluids , 1970 , 18 , 221-226.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

222 – WALDMANN Th., Mc INTIRE R.
Serum alpha fetoprotein levels in patients with ataxia telangiectasia
Lancet , 1972 , ii , 1112-1115.

223 – WATTRE P., CAMUS D.
L'alpha foetoprotéine ou fétuine et son intérêt en biologie humaine.
Lille Médical , 1972 , 10 , 1454-1459.

224 – WEISS Y., BARGE J., WEISS A.M., FELDMANN G.
Dysembryone malin et alpha foetoprotéine.
Nouv. Presse Med., 1972 , 1 , 323-324

225 – ZIZKOVSKY V., MASOPUST J., PROKES J.
Fetoprotein level development in the first days of life of some mammals.
in Protides of the biological fluids , 1970 , 18 , 49-54.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

TRAVAUX ANTERIEURS

I – INTRODUCTION 2

II – PHYSIOLOGIE 3

2-1 BIOSYNTHESE 3

2-2 METABOLISME 3

2-3 ROLE BIOLOGIQUE 3

2-4 REAPPARITION DANS L'ORGANISME 3

III – MECANISME DE LA REAPPARITION DE L'AFP 4

3-1 HYPOTHESES 4

3-2 MISE EN EVIDENCE 4

3-2-1 Au cours des hépatomes 4

3-2-2 Au cours des tératomes 4

3-2-3 Au cours des cancers secondaires hépatiques 5

3-2-4 Au cours des cancers primitifs autres que l'hépatome 5

3-2-5 Au cours des hépatites 5

3-2-6 Au cours de la tyrosinémie 6

IV – ETUDE ANALYTIQUE 6

4-1 ISOLEMENT ET PURIFICATION 6

4-2 PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES 7

4-3 MISE EN EVIDENCE 8

4-3-1 Procédés électrophorétiques 8

4-3-2 Procédés immunochimiques 8

4-3-2-1 Généralités 8

4-3-2-2 Double immunodiffusion selon OUTCHERLONY (DID) 10

4-3-2-3 Electroimmunodiffusion selon LAURELL (EID) 11

4-3-2-4 Immunoélectrophorèse 11

4-3-2-5 Immunoélectrophorèse à contre courant (IECC) 11

4-3-2-6 Méthodes radioimmunochimiques 12

4-3-2-7 Hémagglutination 13

4-3-2-8 Immunofluorescence (IF) 13

4-3-2-9 Agglutination au Latex 14

4-3-2-10 Sensibilité comparée des techniques de détection 14

4-4 METHODES DE DOSAGE 14

4-4-1 Techniques immunochimiques 15

4-4-1-1 Immunodiffusion radiale selon MANCINI (IDR) 15

4-4-1-2 Electroimmunodiffusion selon LAURELL (EID) 16

4-4-2 Techniques radioimmunochimiques 17

V – INTERET DIAGNOSTIQUE 17

5-1 EN CANCEROLOGIE 17

5-1-1 Cancer primitif du foie (CPF) 17

5-1-2 Dysembryomes malins 20

5-1-3 Autres tumeurs 20

5-2 HEPATOPATHIES NON CANCEREUSES 21

5-2-1 Hépatites 21

5-2-2 Hémochromatoses 22

5-2-3 Cirrhoses ... 22

5-2-4 Steatose hépatique ... 22

5-2-5 Ataxie-télangectasie ... 22

5-3. EN GENETIQUE ... 22

5-4 EN OBSTETRIQUE ... 23

TRAVAUX PERSONNELS

I – ETUDE ANALYTIQUE ... 24

1-1 TECHNIQUES DE RECHERCHE ... 24

1-1-1 Technique de double diffusion en gel d'agarose : DID ... 24

1-1-2- Immunoélectrophorèse à contre courant sur cellogel : IECC ... 25

1-1-3 Immunoélectrophorèse à contre courant sur agarose ... 26

1-1-4 Avantages et inconvénients respectifs de chaque technique ... 28

1-1-5 Technique au Latex ... 28

1-1-6 Electrophorèse en gel de polyacrylamide ... 29

1-2 ETUDE DE LA SENSIBILITE DES TECHNIQUES DE RECHERCHE ... 30

1-2-1 Sensibilité comparée de la DID, IECC sur agarose et sur cellogel ... 30

1-2-2 Etude comparative de la sensibilité des trois techniques précédentes et de celle au latex ... 31

1-2-3 Seuil de détection de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ... 32

1-3 TECHNIQUES DE DOSAGE ... 33

1-3-1 Immunodiffusion radiale ... 33

1-3-2 Technique d'électroimmunodiffusion sur cellogel : EID ... 34

1-4 RESULTATS ... 36

1-4-1 Vérification de la linéarité de l'IDR ... 36

1-4-2 Etude de la reproductibilité de l'IDR ... 37

1-4-3 Conditions optima de l'EID ... 38

1-4-4 Vérification de la linéarité de l'EID 38

1-4-5 Etude de la reproductibilité de l'EID 38

1-4-6 Comparaison entre la technique d'IDR et d'EID 40

II – INTERET CLINIQUE 41

2-1 RESULTATS 41

2-1-1 Cancer primitif du foie : CPF 42

2-1-1-1 Répartition des malades 42

2-1-1-2 Evolution du taux d'AFP 44

2-1-1-3 Répartition des concentrations sériques 47

2-1-1-4 Fréquence des cas (AFP positif) en fonction du sexe, de l'âge 47

2-1-2 Hépatocholangiome 47

2-1-3 Cancers secondaires du foie 47

2-1-4 Cancers primitifs sans métastase hépatique 48

2-1-5 Hépatites virales 49

2-1-6 Cirrhoses 51

2-1-7 Autres cas 52

III – DISCUSSION 53

IV – CONCLUSIONS 56

BIBLIOGRAPHIE

TABLE des MATIERES

Association Corporative des Etudiants en Médecine de Lyon
8, avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 2 - Tél. (78) 74-33-47

Association Corporative des Etudiants en Médecine de Lyon
8, avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 2 - Tél. (78) 74-33-47